



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Rafael Koerich Varaschin

**Participação dos receptores opióides do núcleo
accumbens na tolerância rápida ao etanol em ratos.**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Gina Struffaldi Morato

Florianópolis – SC

2005

VARASCHIN, Rafael Koerich. **Participação dos receptores opióides do núcleo *accumbens* na tolerância rápida ao etanol em ratos.** Florianópolis, 2005. 78 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Curso de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Gina Struffaldi Morato.

Defesa: 30/05/2005.

Estudos anteriores mostraram que a [naltrexona] (NTX), um antagonista opióide não-seletivo, reduz o consumo de [etanol] (ET) e impede o desenvolvimento de tolerância aguda ao ET em ratos. Outros estudos mostraram que as porções *core* e *shell* do [núcleo *accumbens*] (NAcc) são importantes na iniciação, manutenção do consumo e dependência ao ET. Neste trabalho verificou-se que injeção sistêmica de NTX impede o desenvolvimento de [tolerância rápida] (TR) a incoordenação motora provocada por ET em ratos, efeito que foi revertido com doses equivalentes de morfina. O bloqueio da TR ao ET também foi verificado com a injeção local de NTX nas porções *core* ou *shell* do NAcc, sugerindo a participação de receptores desta estrutura na modulação da TR ao ET. Para esclarecer qual o subtipo de receptor opióide envolvido no bloqueio da TR pela NTX verificou-se o efeito da administração intra-NAcc de antagonistas seletivos para os receptores μ -, δ - e κ -opióides, respectivamente [naloxonazina] (NLZ), [naltrindol] (NTD) e [nor-binaltorfimina] (BNI). A injeção de NLZ nas porções *core* e *shell* impediu a TR ao ET, enquanto que a injeção de BNI na porção *core* promoveu efeitos diferenciados. A injeção de BNI na porção *shell*, e de NTD nas porções *core* e *shell* não afetou a TR ao ET neste modelo. Os resultados sugerem uma modulação positiva do NAcc, em particular através do receptor μ -opióide, no desenvolvimento de TR ao ET em ratos.

*“A mente que se abre para uma
nova idéia jamais retorna ao seu
tamanho original”*

Albert Einstein

*Aos meus pais, Laura Miriam e
Vanderlei, por todo o incentivo,
carinho e amor.*

AGRADECIMENTOS

Desde a iniciação científica até o término do mestrado foram praticamente cinco anos de convívio diário com professores, alunos e funcionários do departamento de Farmacologia. Obviamente, a lista de agradecimentos não poderia ser curta, embora algumas pessoas, por omissão ou esquecimento da minha parte acabaram não sendo incluídas.

Nossa limitada capacidade em controlar o destino me fez, em janeiro de 2000, procurar vaga em diversos laboratórios da Universidade Federal de Santa Catarina. No entanto este mesmo destino escolheu o Laboratório de Psicofarmacologia, liderado pela Prof.^a Dr.^a Gina Struffaldi Morato, para minha iniciação no meio acadêmico. A prof.^a Gina foi minha tutora e madrinha durante estes primeiros anos de carreira científica. Sua dedicação inegável à arte de ensinar e à ciência, além da paciência para com um aluno nem sempre disciplinado e por vezes “teimoso”, como ela mesma dizia, são fontes da minha maior gratidão e eu espero levar comigo parte do seu caráter e princípios éticos nos anos vindouros.

A acolhida no laboratório foi inicialmente feita pelos colegas Alcides, Roberta, Adriana, Marcio, Rafaela e, em especial, Elisabeth, a quem agradeço por dedicaram parte do seu precioso tempo a ensinar e treinar aquele novo aluno na rotina e nas técnicas utilizadas no laboratório. No período mais recente sou muito grato ao Inácio, Fabiana, Maristela, Leonardo, Dayana e Alexandra pela força que deram nos momentos finais da dissertação além, é claro, da boa companhia e das boas risadas sem as quais é impossível

viver. Deixo também meu agradecimento a todos os colegas do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, em especial a Maria Alcina, Elisângela, Cláudia, Giselle, Sílvia, Geison, Marcelo, Fabrício Assini, Fabrício Pamplona, Leandro, Rui, George, Filipe e Luciano, dos quais compartilho muitos momentos de alegria (festas, congressos, churrascos e *happy hours*) e alguns de sofrimento (especialmente as vésperas de seminários).

Também fica minha gratidão aos professores do departamento; Thereza, Rosa, Pádua, Giles, Tadeu, Jamil, Calixto, André, Anicleto e Rogério, pela acessibilidade e disponibilidade em ajudar no desenvolvimento dos alunos, tanto na graduação quanto na pós, e em especial ao prof Reinaldo Takahashi pela estreita colaboração no desenvolvimento deste trabalho e por acolher-me em seu laboratório durante o período em que a prof.^a Gina esteve no exterior. Agradeço ainda aos professores José Marino Neto e Zenilda Bouzon pelo auxílio na confecção das lâminas histológicas e também aos funcionários da farmacologia, em especial ao Pedro, bioterista e churrasqueiro oficial da Farmaco, pela sua dedicação muito além dos 100 %.

Por fim, àqueles cujo exemplo e dedicação fizeram de mim o que sou: meus familiares, amigos, meus irmãos Mateus e Rubens; meus avós Laura, Iolanda, Paulo e Valdomiro e em especial aos meus pais Laura Miriam e Vanderlei. AMO VOCÊS!

SUMÁRIO

Lista de abreviações	iii
Lista de figuras	iv
Resumo	v
Abstract	vii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 <i>Farmacocinética e farmacodinâmica do álcool</i>	3
1.2 <i>Efeitos reforçadores do etanol na via mesolímbica</i>	8
1.3 <i>O fenômeno da tolerância</i>	14
2. OBJETIVOS	19
2.1 <i>Objetivos gerais</i>	19
2.2 <i>Objetivos específicos</i>	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 <i>Animais</i>	20
3.2 <i>Drogas e reagentes</i>	20
3.3 <i>Anestesia</i>	21
3.4 <i>Confecção das cânulas guia</i>	21
3.5 <i>Cirurgia estereotáxica</i>	22
3.6 <i>Teste do plano inclinado</i>	23
3.7 <i>Procedimentos experimentais</i>	24
3.7.1 <i>Experimento 1: Efeito da naltrexona sobre a tolerância rápida ao etanol.</i>	24

<u>3.7.2 Experimento 2: Efeito da co-administração de</u>	
<u>morfina e naltrexona sobre a tolerância rápida ao etanol</u>	25
<u>3.7.3 Experimento 3: Efeito da administração de antagonistas</u>	
<u>opióides nas porções core e shell do núcleo accumbens</u>	25
<u>3.8 Perfusão e histologia</u>	26
<u>3.9 Análise estatística</u>	27
4. RESULTADOS	29
<u>4.1 Efeito da injeção sistêmica de naltrexona sobre a tolerância</u>	
<u>rápida ao etanol</u>	30
<u>4.2 Efeito da co-administração sistêmica de naltrexona e morfina</u>	
<u>na tolerância rápida ao etanol</u>	33
<u>4.3 Efeito dos antagonistas opióides seletivos administrados nas porções</u>	
<u>core ou shell do núcleo accumbens sobre a tolerância rápida ao etanol</u>	34
5. DISCUSSÃO	42
6. CONCLUSÕES	53
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
8. ANEXO	66

LISTA DE ABREVIATURAS

<u>ADH</u>	<u>álcool-desidrogenase</u>
<u>ALDH</u>	<u>aldeído-desidrogenase</u>
<u>AMPA</u>	<u>alfa-amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazol propionato</u>
<u>AMPC</u>	<u>monofosfato de 3', 5'-adenosina cíclico</u>
<u>ANOVA</u>	<u>análise de variância</u>
<u>AP</u>	<u>antero-posterior</u>
<u>BNI</u>	<u>nor-binaltorfimina</u>
<u>CID</u>	<u>Classificação Internacional de Doenças</u>
<u>Cl-</u>	<u>íons cloreto</u>
<u>DV</u>	<u>dorso-ventral</u>
<u>E</u>	<u>etanol</u>
<u>EPM</u>	<u>erro padrão da média</u>
<u>GABA</u>	<u>ácido gama-aminobutírico</u>
<u>i.p.</u>	<u>intraperitoneal</u>
<u>MgSO₄.7H₂O</u>	<u>sulfato de magnésio heptahidratado</u>
<u>ML</u>	<u>meso-lateral</u>
<u>MOR</u>	<u>morfina</u>
<u>NaCl</u>	<u>cloreto de sódio</u>
<u>NAD⁺</u>	<u>nicotinamida adenina dinucleotídeo</u>
<u>NaOH</u>	<u>hidróxido de sódio</u>
<u>NLZ</u>	<u>naloxonazina</u>
<u>NMDA</u>	<u>n-metil-d-aspartato</u>
<u>NTD</u>	<u>naltrindol</u>
<u>NTX</u>	<u>naltrexona</u>
<u>S</u>	<u>salina</u>
<u>VEI</u>	<u>veículo</u>
<u>VTA</u>	<u>área tegmentar ventral</u>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação da via dopaminérgica mesolímbica no cérebro do rato	10
Figura 2: Ligação e expressão de RNAm para os receptores μ -, δ - e κ -opióides no núcleo <i>accumbens</i> e caudado putamen	13
Figura 3: Teste do plano inclinado	24
Figura 4: Tolerância rápida ao etanol ao longo do tempo	29
Figura 5: Efeito da injeção de naltrexona i.p. na tolerância rápida ao etanol	31
Figura 6: Efeito da naltrexona sobre a tolerância rápida ao longo do tempo	32
Figura 7: Efeito da co-administração de naltrexona e morfina na tolerância rápida ao etanol	33
Figura 8: Efeito da microinjeção de naltrexona na porção <i>shell</i> do núcleo <i>accumbens</i> sobre a tolerância rápida ao etanol	35
Figura 9: Efeito da microinjeção de naltrexona na porção <i>core</i> do núcleo <i>accumbens</i> sobre a tolerância rápida ao etanol	36
Figura 10: Efeito da microinjeção do antagonista μ -opióide naloxonazina no núcleo <i>accumbens</i> sobre a tolerância rápida ao etanol	37
Figura 11: Efeito da microinjeção do antagonista δ -opióide naltrindol no núcleo <i>accumbens</i> sobre a tolerância rápida ao etanol	38
Figura 12: Efeito da microinjeção do antagonista κ -opióide nor-binaltorfimina no núcleo <i>accumbens</i> sobre a tolerância rápida ao etanol	40
Figura 13: Diagramas coronais representando o local das microinjeções nas porções <i>core</i> ou <i>shell</i> do núcleo <i>accumbens</i>	41

RESUMO

Estudos anteriores demonstraram que a naltrexona (NTX), um antagonista opióide não-seletivo, reduz o consumo de etanol e o número de recaídas através do bloqueio da liberação de dopamina no núcleo *accumbens*. Além disso, foi demonstrado que a NTX impede o desenvolvimento de tolerância aguda em ratos. O objetivo deste trabalho foi verificar se a injeção sistêmica ou intra-*accumbens* de NTX ou de antagonistas seletivos para os receptores μ -, δ - e κ -opióides, respectivamente naloxonazina (NLZ), naltrindol (NTD) e nor-binaltorfimina (BNI), bloqueiam a tolerância rápida ao etanol em ratos.

Grupos de Ratos Wistar receberam injeção sistêmica de NTX (0,1; 0,3; 0,6; 1 e 3 mg/kg i.p.) ou veículo. Em seguida cada grupo foi dividido em dois grupos tratados com etanol (2,7 g/kg, 20% p/v, i.p.) ou salina respectivamente. O prejuízo motor (ângulo de queda) foi avaliado no plano inclinado aos 30, 45, 60 e 75 min após o tratamento. Depois de 24 h (Dia 2) todos os animais receberam etanol (2,7 g/kg i.p.) e foram novamente avaliados no plano inclinado. Para verificar a participação dos receptores opióides do núcleo *accumbens* ratos Wistar foram implantados com cânulas direcionadas às porções *core* ou *shell* do núcleo *accumbens*. Sete dias após a cirurgia diferentes grupos receberam injeção intra-*accumbens* de NTX (5-20 μ g/0,3 μ l), NLZ (2-4 μ g/0,3 μ l), NTD (2-4 μ g/0,5 μ l), BNI (2,5-5 μ g/0,3 μ l) ou veículo (0,3 μ l). Em seguida cada grupo foi dividido em dois grupos tratados com etanol (2,7 g/kg i.p.) ou salina respectivamente. O prejuízo motor foi avaliado como descrito anteriormente. No dia 2 todos receberam apenas etanol e foram novamente testados.

No Dia 1 apenas o etanol provocou prejuízo motor significativo (ANOVA de duas vias, $p < 0,05$). No Dia 2 a injeção repetida de etanol provocou reduzido prejuízo motor nos grupos tratados com etanol+veículo, sugerindo tolerância. A injeção sistêmica de 0,3 e 0,6 mg/kg de NTX impediu o desenvolvimento de tolerância, efeito que foi revertido pela co-administração de morfina. A injeção intra-*accumbens* de NTX na porção *core* (dose de 20 μ g) e na porção *shell* (doses de 10 e 20 μ g) bloqueou a tolerância ao etanol. A injeção de 4 μ g de NLZ nas porções *core* ou *shell* bloqueou a tolerância ao etanol. A injeção de 5 μ g de BNI na porção *core* provocou redução do prejuízo motor nos animais tratados com BNI+salina. As injeções de BNI na porção *shell* e de NTD nas porções *core* e *shell* não afetaram a tolerância ao álcool.

Os resultados sugerem que o sistema opióide presente no núcleo *accumbens* influencia positivamente o desenvolvimento de tolerância rápida à incoordenação motora provocada por etanol. Além disso, sugerem que o receptor μ - esteja principalmente envolvido no bloqueio da tolerância pela naltrexona. O efeito diferenciado observado pela injeção da BNI pode dever-se à localização pré-sináptica do receptor κ -opióide no núcleo *accumbens*.

ABSTRACT

Evidence suggests a participation of the opioid system in the control of ethanol reinforcement and drinking. Previous findings have shown that naltrexone, an opioid antagonist that decreases ethanol consumption in man and experimental animals, reduces the acquisition of acute tolerance to ethanol in rats. Nevertheless, there are few data regarding the role of opioid system in the acquisition of ethanol tolerance in brain areas involved in the rewarding actions of ethanol. This study investigates the effects of systemic and intra-accumbens injection of the non-selective opioid antagonist naltrexone (NTX), and the μ -, δ - and κ -opioid antagonists respectively naloxonazine (NLZ), naltrindole (NTD) and nor-binaltorphimine (BNI), on rapid tolerance to motor impairment caused by ethanol.

Male Wistar rats received intraperitoneal injections of naltrexone (0.1 - 3.0 mg/kg) or microinjections into the core or shell portions of the nucleus accumbens of NTX (5 - 20 μ g/0.3 μ l), NLZ (2 - 4 μ g/0.3 μ l), NTD (2 - 4 μ g/0.5 μ l), BNI (2.5 - 5 μ g/0.3 μ l) or vehicle before ethanol (2.7 g/kg, i.p.) or saline. The animals were tested for motor coordination on the tilting plane apparatus at 30, 45, 60 and 75 min after ethanol or saline injections. Tolerance was assessed 24 h later by administering the same dose of ethanol to all animals and re-testing them on the tilting plane.

On Day 1 only rats that received ET showed motor impairment. On Day 2 control groups that received vehicle + ethanol on Day 1 showed reduced motor impairment, suggesting tolerance. Systemic injection of NTX (0.3 and 0.6 mg/kg) blocked rapid tolerance to ethanol, an effect prevented by co-administration of morphine. Injection of NTX into the core (20 μ g) or shell (10 and 20 μ g) blocked rapid tolerance to ethanol, as

well as injection of NLZ (4 µg) either into the core or shell portions. Injection of BNI into the core (5 µg) resulted in reduction of motor impairment on Day 2 in rats that not received ethanol on Day 1. Pretreatment with BNI into the shell or NTD into either core or shell portions did not affect tolerance to ET.

The results strength the notion that the opioid system in the nucleus accumbens may be involved in the development of ethanol tolerance. This study also suggests that µ-opioid receptors in both core and shell, and κ-opioid receptors in the core portion may play a role in this phenomenon.

1. INTRODUÇÃO

O álcool etílico ou etanol é uma molécula orgânica derivada da fermentação de açúcares, composta por dois átomos de carbono ligados a um radical hidroxila e cinco átomos de hidrogênio. Talvez por suas propriedades farmacológicas e facilidade de obtenção, esta seja uma das drogas mais consumidas atualmente. O uso do álcool etílico, no entanto, remonta a tempos pré-históricos, quando as primeiras sociedades agricultoras descobriram, provavelmente por acidente, o processo de fermentação e produção de bebidas alcoólicas (Sullivan e Hagen, 2002). Apesar da origem do consumo de álcool ter-se perdido no tempo, muitos relatos podem ser encontrados na Bíblia, na filosofia greco-romana, em tumbas egípcias bem como em diversas outras sociedades tecnologicamente avançadas como na China e América pré-colombiana. Tais relatos estão freqüentemente associados ao espiritual e religioso, e em certas sociedades (por exemplo, os Astecas) o seu uso era restrito aos sacerdotes (Paredes, 1975).

O uso abusivo do álcool, ou seja, o consumo excessivo e prejudicial ao indivíduo também é conhecido há bastante tempo, sendo inclusive citado no poema épico de Homero “A Odisseia”, escrito por volta de 680 a.C. Apesar de fazer parte do cotidiano ocidental, o uso exagerado do álcool é desaprovado pela sociedade e um forte estigma moral é freqüentemente atribuído a este comportamento. Foi apenas em meados do século XIX, no entanto, que a dependência do álcool passou a ser encarada mais como problema médico do que uma falha de caráter. Magnus Huss (1848) propôs a dependência ao álcool como uma intoxicação crônica caracterizada pelo uso contínuo de bebidas alcoólicas apesar do usuário (dependente) ter consciência dos malefícios causados por estas. A primeira Classificação Internacional de Doenças (CID), elaborada em 1893, enquadrava o uso abusivo de drogas

na seção de doenças gerais; aquelas que afetam o organismo como um todo. Entretanto, foi apenas em 1950, na 6^a revisão da CID, que o uso abusivo de substâncias psicoativas passou a ser encarado como um problema mental (Kalant, 1998).

Durante a segunda metade do séc XX diversas sociedades de psiquiatria procuraram uma melhor forma de definir o alcoolismo e suas características, e uma nova classificação foi lançada mais ou menos a cada dez anos. As diversas revisões e a falta de consenso entre estas entidades pode ser atribuída ao padrão progressivo de alterações comportamentais existentes entre o consumo não-prejudicial e a dependência do álcool (National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism, 1995; O'Brien, 2000;). Em 1994, a Associação Americana de Psiquiatria cunhou o termo *síndrome de dependência de substância*, englobando as alterações comportamentais, entre elas o desenvolvimento de tolerância, em decorrência da falta de controle no consumo de diversas drogas, inclusive o álcool (American Psychiatric Association - APA, DSM-IV RT, 2000). De acordo com Manual Diagnóstico Estatístico (DSM-IV) o diagnóstico de *síndrome de dependência de substância* é determinado pela presença de três ou mais sintomas decorrentes do uso continuado de uma substância psicoativa durante o período de um ano ou mais (para uma visão abrangente do quadro de sintomas definido pela APA, ver tabela 4 em anexo).

A Organização Mundial da Saúde estima que cerca de 2 bilhões de pessoas consumam álcool em todo o mundo e, aproximadamente, 76,3 milhões de pessoas sofram de doenças diretamente relacionadas ao uso de álcool (por exemplo: cirrose hepática, câncer da orofaringe, psicose alcoólica). Anualmente 1,8 milhões de mortes são provocadas pelo uso de bebidas alcoólicas (3,2 % do total), sendo que os acidentes não-intencionais correspondem a aproximadamente um terço destas mortes. A distribuição do

ônus social provocado pelo álcool não é igual entre os países; o consumo de álcool é o principal risco à saúde em países em desenvolvimento com baixo crescimento populacional (como o Brasil, México e Argentina) e o terceiro da lista em países desenvolvidos (WHO, 2004).

No Brasil, o I Levantamento Domiciliar Nacional sobre Uso de Drogas Psicotrópicas, realizado pelo Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas (CEBRID, 2002), constatou uma prevalência de alcoolismo em 11,2 % da população. O consumo de álcool no Brasil, apesar de elevado (5,32 L *per capita* por ano), é inferior ao de países desenvolvidos como os EUA (8,51 L), Reino Unido (10,39 L), Alemanha (12,89 L) ou França (13,54 L de álcool *per capita* por ano) (WHO, 2004).

Com relação à síndrome de dependência do álcool, um dos maiores questionamentos refere-se aos mecanismos que fazem algumas pessoas tornarem-se dependentes e outras não. Atualmente, a ciência vem empreendendo um imenso esforço visando elucidar estes mecanismos e as vulnerabilidades individuais que irão resultar na perda do controle da ingestão de álcool. Algumas particularidades do alcoolismo, sob o ponto de vista da psicofarmacologia, serão discutidas no decorrer deste trabalho.

1.1 Farmacocinética e farmacodinâmica do etanol.

Após a ingestão, o álcool é rapidamente absorvido em grande parte no estômago e duodeno, sendo a maior parte (90 - 98%) metabolizada e o restante excretado na urina e respiração sem sofrer modificações. A enzima álcool-desidrogenase (ADH), presente no citossol, é responsável por cerca de 75% da biotransformação do álcool. Esta enzima atua oxidando o etanol a acetaldeído, utilizando NAD^+ como cofator. O acetaldeído, por sua vez,

é oxidado a ácido acético pela ação da aldeído-desidrogenase (ALDH), utilizando NAD^+ como cofator. O ácido acético, por sua vez, pode ser metabolizado a dióxido de carbono e água, ou utilizado na síntese de outras moléculas (Matsumoto e Fukui, 2002).

O ser humano possui até 17 isoenzimas distintas de álcool-desidrogenases, distribuídas essencialmente no fígado e no estômago (Ehrig *et al.*, 1990). Estas enzimas variam por sua especificidade de substrato, K_m e V_{max} . Embora o etanol seja metabolizado principalmente pelas álcool-desidrogenases, cerca de 25% do metabolismo ocorre por ação do citocromo P-450 IIE1 no retículo endoplasmático. Esta via metabólica tende a estar aumentada no consumo crônico do álcool, e pode gerar um número elevado de radicais livres, moléculas altamente reativas por possuírem um par de elétrons livres (para uma revisão ver Lands, 1997; Lieber, 2004). Outra enzima capaz de degradar o etanol é a catalase. Embora sua função ainda não seja bem compreendida, é possível que desempenhe um papel importante no cérebro, onde as demais enzimas da via de degradação do álcool não são encontradas em quantidades expressivas (Correa *et al.*, 2004; Pastor *et al.*, 2004).

O produto imediato do álcool etílico, o acetaldeído, é oxidado a ácido acético por uma classe de enzimas conhecidas como aldeído-desidrogenases. Embora estas enzimas ocorram em muitos tecidos, o fígado é o principal sítio de metabolismo do acetaldeído (Lieber, 1991; Lands, 1997). Quatro isoenzimas distintas de ALDH foram purificadas do fígado humano. A isoenzima presente na mitocôndria pode atuar mesmo em pequenas quantias de acetaldeído, e é a principal responsável pela oxidação desta substância (Tipton *et al.*, 1993). A isoforma de ALDH predominante em cada indivíduo pode determinar a velocidade de metabolização do acetaldeído. Uma variante da ALDH mitocondrial, presente em cerca de 50% da população asiática, deriva de uma mutação de um único

aminoácido que reduz drasticamente a atividade enzimática, provocando acúmulo de acetaldeído (Impraim *et al.*, 1982; Goedde *et al.*, 1985). Indivíduos portadores desta isoenzima sofrem de efeitos desagradáveis decorrentes do acúmulo de acetaldeído após a ingestão de bebidas alcoólicas (Goedde *et al.*, 1983; Inoue *et al.*, 1984).

O etanol possui um efeito depressor bem conhecido sobre o sistema nervoso central. Em seres humanos, a sociabilidade e euforia aumentam em concentrações sangüíneas próximas de 50 mg/dl, em decorrência da redução de um estado fisiológico de ansiedade. (Gallate *et al.*, 2003; Breese *et al.*, 2005) Nesta concentração os indivíduos freqüentemente ficam mais falantes e, em alguns casos, violentos e agressivos. Em concentrações sangüíneas de 50 – 100 mg/dl o efeito depressor passa a predominar, refletindo-se em distúrbios no equilíbrio, concentração e tempo de resposta aumentado. Ataxia, fala arrastada e prejuízo na função motora e mental, incluindo distúrbios na memória de curta duração, estão presentes em concentrações de 100 – 150 mg/dl. Concentrações mais altas levam progressivamente à perda dos sentidos, coma e morte por parada respiratória (Hunt, 1998). É importante salientar que estes efeitos não são linearmente progressivos e a sensibilidade ao etanol pode variar muito de indivíduo para indivíduo, inclusive para efeitos diferentes em um mesmo indivíduo. Em linhagens de camundongos selecionadas pelo efeito sedativo de uma dose alta de etanol, por exemplo, é possível verificar diferenças em outros comportamentos quando injetadas doses menores, que não necessariamente correspondem à diferença observada no efeito sedativo (Dudek e Phillips, 1990).

O etanol é capaz de afetar todas as células do organismo, mas seus efeitos comportamentais devem-se majoritariamente à ação sobre neurônios. A atividade neuronal pode ser afetada basicamente de três formas: (1) perturbação de lipídeos da membrana

plasmática, (2) alteração da função de receptores de membranas e (3) alteração dos mecanismos intracelulares de transdução do sinal e metabolismo celular.

A capacidade de várias moléculas não estruturalmente relacionadas atuarem como anestésicos gerais levou à sugestão de que um mecanismo comum, possivelmente ao nível de lipídeos da membrana plasmática, pudesse estar envolvido nesse efeito. O etanol é capaz de incorporar-se a domínios hidrofóbicos da membrana, alterando sua conformação e, conseqüentemente, sua funcionalidade (Seemam, 1972; Tabakoff e Hoffman, 1983; Hunt e Majchrowicz, 1983). Embora a influência do etanol sobre as membranas celulares seja comprovada em concentrações altas, muitos dos estudos realizados nos anos 80 falharam em detectar qualquer alteração nas concentrações mais baixas, ou seja, aquelas que promoviam alterações comportamentais *in vivo* (Wing *et al.*, 1982; Fleuret-Balter *et al.*, 1983; Hunt e Mullin, 1985; Nie *et al.*, 1989). Conseqüentemente a teoria da ação do etanol sobre membranas lipídicas foi deixada de lado em favor da teoria da ação sobre proteínas de membrana (Tas *et al.*, 1987; Franks e Lieb, 2004). Portanto, nos últimos vinte anos a pesquisa tem se voltado ao estudo dos efeitos álcool sobre neurotransmissores específicos, receptores que interagem com estes, canais iônicos e mensageiros intracelulares.

Vários neurotransmissores estão envolvidos nos efeitos do etanol. Entretanto, talvez por sua abundância no sistema nervoso central, os sistemas gabaérgico e glutamatérgico sejam responsáveis por grande parte das alterações provocadas pela exposição de curta ou longa duração ao álcool. Um grande volume de evidências sugere que os receptores GABA_A desempenhem um papel fundamental nos efeitos do etanol. Estes receptores localizam-se primariamente em membranas pós-sinápticas, embora também possam ocorrer fora da sinapse, e são formados por cinco subunidades entre diferentes tipos (α_{1-6} , β_{1-4} , γ_{1-3} ,

ρ_{1-2} , δ , ϵ , θ , e π) que circundam um poro central (Vicini e Ortinski, 2004). Quando os receptores GABA_A são expostos a concentrações farmacologicamente relevantes de etanol ocorre a potencialização das correntes de Cl⁻ desencadeadas pelo neurotransmissor GABA (para uma revisão ver Davies, 2003; Hancher *et al.*, 2004) resultando em sedação, redução da ansiedade e amnésia (Ryabinin, 1998).

O sistema glutamatérgico, que desempenha função excitatória em mais da metade de todas as sinapses do sistema nervoso central, pode ser bloqueado pelo etanol (Dildy-Mayfield e Leslie, 1989). O glutamato liberado pelo neurônio pré-sináptico pode ligar-se a dois grupos de receptores: metabotrópicos (mGluRs) e ionotrópicos (iGluRs). Enquanto os mGluRs atuam através de segundos mensageiros, os iGluRs do tipo AMPA, kainato e NMDA permitem o fluxo de íons (principalmente Na⁺) através da membrana celular. Agudamente, o etanol inibe a atividade do receptor NMDA *in vitro* (Lovinger *et al.*, 1989) e *in vivo* (Simson *et al.*, 1991). Além disso, os receptores NMDA e AMPA estão envolvidos em certos aspectos do alcoolismo, como a síndrome de abstinência, sensibilização, compulsão, recaídas e tolerância (Khanna *et al.*, 1991, 1992; Carlezon e Nestler, 2002; Ron, 2004).

Além da ação sobre canais iônicos, o etanol afeta grande parte dos demais sistemas de neurotransmissão e segundos-mensageiros. Evidências da ação do álcool nestes sistemas tem sido extensivamente revistas na literatura. Alguns exemplos incluem o prejuízo cognitivo e de memória por interferência no sistema colinérgico (Hodges *et al.*, 1991), a liberação de anandamida seguida da redução no número e na atividade dos receptores CB₁ (Hungund e Basavarajappa, 2000), e a modulação do consumo de etanol pelo neuropeptídeo Y (Ehlers *et al.*, 1998; Hwang *et al.*, 1999; Gilpin *et al.*, 2004). Além disso,

os transportadores de membrana para a adenosina (Mailliard e Diamond, 2004) e serotonina (Heinz *et al.*, 1998; Kelai *et al.*, 2003) parecem influenciar a preferência e tolerância ao etanol. No interior da célula demonstrou-se aumento dos níveis de AMPc após exposição aguda ao etanol (Gordon *et al.*, 1986), seguida de redução do AMPc intracelular provavelmente devido à dessensibilização de receptores acoplados à proteína G_s (Charness *et al.*, 1988; Mochly-Rosen *et al.*, 1988). Foi verificado que a Fyn quinase modula a tolerância aguda ao álcool e suas propriedades ansiolíticas e hedônicas (Boehm II *et al.*, 2003), e as PKC γ e PKC ϵ modulam a sensibilidade do receptor GABA_A ao etanol (Song e Messing, 2005).

Nos últimos anos um grande destaque tem sido dado ao sistema dopaminérgico na modulação dos mecanismos ligados a dependência do álcool. Estudos sugerem uma relação entre a liberação de dopamina em determinadas áreas do cérebro (núcleo *accumbens*, área tegmentar ventral entre outras) com a sensação de recompensa e satisfação gerada pelo consumo de álcool (Nestler e Aghajanian, 1997; Koob e LeMoal, 1997). Além disso, o sistema opióide, por mediar ações do etanol no sistema dopaminérgico, pode interferir na resposta de recompensa possivelmente através da liberação de β -endorfinas e encefalinas (Gianoulakis, 1993; Herz, 1997; Oswald e Wand, 2004).

1.2 Efeitos reforçadores do etanol na via mesolímbica.

Uma das grandes questões envolvendo a síndrome de dependência de substância concerne à mudança do consumo ocasional e controlado para a perda do controle comportamental sobre o uso da substância. Variáveis farmacológicas, genéticas e ambientais conferem diversidade aos mecanismos e ao curso temporal do desenvolvimento

de dependência a cada droga de abuso, porém, uma característica comum diz respeito ao substrato neural onde estas substâncias agem: com a notável exceção dos agentes psicodélicos, todas são capazes de modular, direta ou indiretamente, a liberação de dopamina em regiões mesolímbicas do cérebro (Di Chiara, 2002; Koob *et al.*, 2004).

O sistema dopaminérgico mesolímbico é composto por corpos neuronais que se originam na área tegmentar ventral (VTA) e projetam seus axônios para áreas do prosencéfalo como o núcleo *accumbens*, córtex pré-frontal, amígdala, tubérculo olfativo. O núcleo *accumbens* do rato, que compõe a base do estriado, pode ser anatomicamente subdividido em duas regiões. A porção *shell* localiza-se mais ventralmente, e está intimamente conectada com a amígdala estendida, uma estrutura composta por um conjunto de regiões límbicas situadas próximas à linha medial, responsável por respostas emocionais. A porção *core*, por sua vez, localiza-se mais dorsalmente e relaciona-se com áreas que controlam a função motora, como o estriado dorsal (Usuda *et al.*, 1998; Zahm 2000).

Além de axônios dopaminérgicos, o núcleo *accumbens* é fortemente innervado por neurônios glutamatérgicos provenientes do córtex pré-frontal, amígdala basolateral, subículo inferior do hipocampo e núcleos hipotalâmicos intralaminares (Kelley e Domesick, 1982; Berendse *et al.*, 1992; Shinonaga *et al.*, 1994). Cerca de 90 % do núcleo *accumbens* compõem-se de neurônios médios espinhosos, essencialmente gabaérgicos (Meredith, 1999). French e Totterdell (2003) demonstraram que neurônios aferentes glutamatérgicos provenientes do córtex pré-frontal, hipocampo e amígdala basolateral podem se sobrepor na modulação destes neurônios gabaérgicos, salientando a função integradora do núcleo *accumbens*. As porções *core* e *shell*, por sua vez, projetam axônios de modo diferenciado: a *shell* faz conexões com o pálido ventral, hipotálamo lateral,

substância negra (parte compacta), área tegmental ventral, substância inominada, área retrorubral e núcleo parabraquial; e a *core* inerva o caudado putamen, substância negra (parte reticulada e compacta), pálido ventral dorsolateral e globo pálido (Usuda *et al.*, 1998).

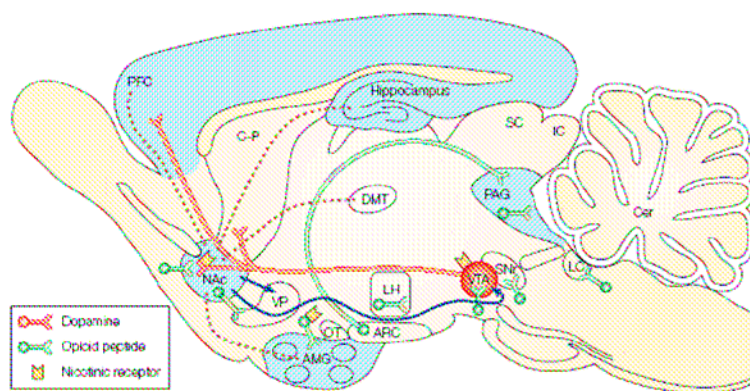


Figura 1: Representação da via dopaminérgica mesolímbica (em vermelho) no cérebro do rato: Corpos neuronais localizados na área tegmental ventral (VTA) projetam axônios para o núcleo *accumbens* (NAc), caudado putamen (C-P) e córtex pré-frontal (PFC). O núcleo *accumbens*, por sua vez, lança projeções (em azul) ao pálido ventral (VP) e VTA, e recebe aferentes (linhas pontilhadas) da amígdala (AMG), tálamo dorsomedial (DMT), hipocampo e córtex pré-frontal. Estruturas representadas: (ARC) núcleo arqueado; (Cer) cerebelo; (IC) colículo inferior; (LC) locus coeruleus; (SC) colículo superior; (PAG) substância cinzenta periaquedutal; (SNr) substância negra reticulada. Adaptado de Nestler (2001).

O mecanismo pelo qual as drogas de abuso afetam a liberação de dopamina na via mesolímbica varia de acordo com a droga, porém, está intimamente relacionado com a propriedade reforçadora da droga. O termo ‘reforço’ refere-se à capacidade de uma determinada substância em desencadear o consumo repetido (ou autoadministração) da mesma. Para substâncias com propriedades reforçadoras, o comportamento de autoadministração em experimentos onde os animais são treinados a operar um mecanismo para

receber uma dose da droga, desenvolve-se rapidamente, inclusive quando as drogas são injetadas diretamente na via mesolímbica (O'Brien, 2000). O reforço gerado por uma substância pode ser medido diretamente, por exemplo, através do número de pressões em uma barra que aciona um mecanismo permitindo acesso a uma pequena quantidade da droga. O reforço pode estar associado à recompensa, que refere-se a sensação subjetiva de bem-estar (hedônica) em decorrência do consumo da droga. Entretanto, uma associação direta entre dopamina e processos hedônicos mediados pelo núcleo *accumbens* é controversa, pois foi demonstrado que a liberação de dopamina no núcleo *accumbens* ocorre apenas durante a aquisição do comportamento de auto-estimulação intracranial, não sendo detectadas variações significativas na manutenção deste comportamento (Garris *et al.*, 1999; revisto por Gonzales *et al.*, 2004).

Assim como ocorre com outras drogas, diversos estudos relatam que a administração de etanol eleva os níveis de dopamina e serotonina no núcleo *accumbens*, estriado e córtex frontal (Di Chiara e Imperato, 1988; Acquas *et al.*, 1993; Di Chiara, 1995; Gonzales e Weiss, 1998). O mecanismo pelo qual o etanol promove este aumento ainda não é bem compreendido, mas existem fortes indícios da interação do álcool com o sistema de peptídeos opióides endógenos, sendo destacada a sua interferência nos processos de recompensa do etanol (Froehlich e Li, 1994; Froehlich e Wand, 1996). Foi demonstrado que antagonistas opióides não seletivos, como a naloxona, naltrexona e nalmefeno, reduzem a auto-administração de etanol sem alterar a atividade locomotora ou a sua farmacocinética (Morgan *et al.*, 1989; Linseman e Le, 1997; Sharpe e Samson, 2001). A capacidade da naltrexona em reduzir o consumo de etanol e o número de recaídas, além de aumentar o tempo de abstinência observada em humanos, primatas e roedores, serviu de

fundamento para seu uso no tratamento do alcoolismo (O'Malley *et al.*, 1992; Volpicelli *et al.*, 1992, 1997; Stromberg *et al.*, 2001).

Um possível mecanismo de ação para a naltrexona é o antagonismo de opióides endógenos que são liberados na via mesolímbica após o consumo de etanol (Gonzales e Weiss, 1998). Esta via, particularmente o núcleo *accumbens*, é rica em receptores opióides acoplados à proteína G_i (figura 2), localizados em neurônios gabaérgicos (subtipos μ - e δ -opióides) e em terminais axônicos dopaminérgicos (κ -opióides) (Mansour *et al.*, 1995). Em condições normais, os opióides endógenos (β -endorfina e encefalinas) liberados após o consumo de álcool atuam em receptores μ - e δ -opióides modulando a liberação de dopamina no núcleo *accumbens* (Olive *et al.*, 2001). A administração sistêmica ou intracerebral de antagonistas seletivos para o receptor μ -opióide reduziu o consumo e a preferência por etanol em ratos ou camundongos geneticamente selecionados pelo alto consumo de etanol (Honkanen *et al.*, 1996; Hyytia e Kiianmaa, 2001; Mhatre e Holloway, 2003), enquanto a administração de antagonistas δ -opióides produziu resultados controversos, reduzindo o consumo ou a preferência em alguns estudos (June *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2000; Hyytia e Kiianmaa, 2001; Ciccocioppo *et al.*, 2002) ou não apresentando diferenças significativas em outros (Honkanen *et al.*, 1996; Stromberg *et al.*, 1998). Além disso, o efeito reforçador do etanol é reduzido em camundongos nocaute para o receptor μ -opióide (Roberts *et al.*, 2000; Hall *et al.*, 2001), sugerindo um papel importante deste receptor no consumo de etanol.

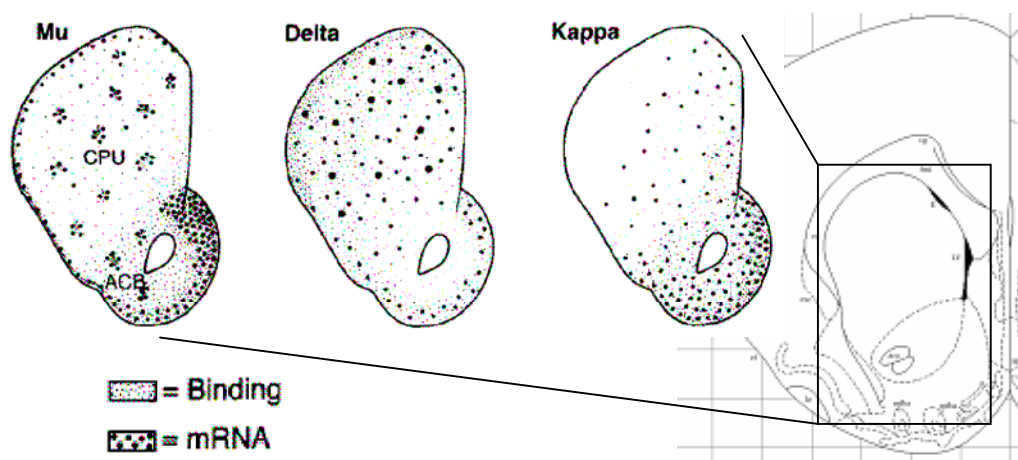


Figura 2: Ligação e expressão de RNAm para os receptores μ - , δ - e κ -opióides no núcleo *accumbens* e caudado putamen. Na porção *shell* do *accumbens* há uma maior intensidade de ligação aos receptores μ - , δ - e κ -opióides, e maior produção de RNAm para os receptores μ - e κ -opióides. Na porção *core* há alta ligação aos receptores μ - e κ -opióides, e baixa ligação do receptor δ -opióide. A expressão de RNAm para este receptor é inexistente na porção *core* (adaptado de Mansour *et al.*, 1995).

Estudos sobre o envolvimento do receptor κ -opióide no consumo e reforço provocado pelo etanol tem gerado peculiaridades interessantes: enquanto que os antagonistas deste receptor falham em alterar o padrão de consumo de etanol (Holter *et al.*, 2000), agonistas seletivos ou drogas com atividade mista de antagonismo dos receptores μ - e δ - e agonismo do receptor κ -opióide atenuaram o consumo e a preferência por etanol (Nestby *et al.*, 1999; Lindholm *et al.*, 2001; Cosgrove e Carroll, 2002). Esta diferença com relação aos receptores μ - e δ -opióides pode dever-se, ao menos em parte, à localização pré-sináptica do receptor κ -opióide (McFadzean *et al.*, 1987; Hjelmstad e Fields, 2001).

Três teorias discutem o papel da via mesolímbica no reforço promovido pelo etanol e outras drogas de abuso: (1) aprendizado associativo; (2) proeminência do estímulo e (3) pressentimento da recompensa (para uma revisão ver Gonzales *et al.*, 2004). Todas elas atribuem à dopamina um papel fundamental no reforço, e é importante salientar que as três teorias se sobrepõem em vários aspectos. Entretanto, até o momento, nenhuma provou estar mais correta que a outra. Além disso, a participação de outras estruturas não integrantes da via mesolímbica no reforço e auto-administração, como a amígdala, por exemplo, somente recentemente começaram a ser investigadas (para uma revisão ver Baxter e Murray, 2002) e seu papel no abuso de substâncias não pode ser descartado. Existem ainda outras teorias a serem consideradas, como a hipótese da redução da tensão (Henniger *et al.*, 2002; Lawyer *et al.*, 2002), que não levam em conta a dopamina. O papel de estados afetivos negativos decorrentes da síndrome de abstinência, por exemplo, provou ser importante na manutenção do comportamento de auto-administração e nas recaídas (Becker e Lopez, 2004; Knapp *et al.*, 2005). Além disso, o desenvolvimento de tolerância, que será alvo do presente estudo, pode contribuir para o aumento do consumo e desenvolvimento de dependência.

1.3 O fenômeno da tolerância.

Em termos farmacológicos, tolerância refere-se a um desvio para a direita na curva dose-resposta porque doses maiores são necessárias para obter um efeito anteriormente obtido com doses mais baixas. Por exemplo, foi demonstrado que após o consumo repetido de etanol, alguns indivíduos são capazes de suportar doses que seriam incapacitantes ou mesmo letais para a maioria das pessoas (Jones, 1999). Considerando a multiplicidade de

efeitos provocados pelo álcool no cérebro e no organismo como um todo, é provável que a tolerância resulte de alterações das respostas em muitos sistemas biológicos e das interações efetuadas entre eles (Fadda e Rossetti, 1998). Deste modo, embora o desenvolvimento de tolerância ao álcool seja facilmente observado através de testes comportamentais, bioquímicos ou fisiológicos, seu mecanismo é complexo e pode envolver alterações metabólicas e farmacodinâmicas.

A tolerância metabólica ocorre quando as enzimas que convertem o etanol a acetaldeído são induzidas, elevando assim a taxa de metabolização do etanol no organismo e, conseqüentemente, reduzindo sua disponibilidade no sistema nervoso central. A atividade do citocromo P450IIE1 aumenta em decorrência da exposição crônica ao etanol, o que não acontece com a álcool-desidrogenase (Lieber, 1988). A indução do citocromo P450IIE1 pode aumentar a taxa de eliminação de vários outros fármacos, resultando na perda da eficácia ou na produção de metabólitos tóxicos (Sellers e Holloway, 1978; Lieber, 1983; Tsutsumi *et al.*, 1990; Tanaka, 2002).

O conceito de tolerância farmacodinâmica parte do pressuposto que, a partir do primeiro momento de exposição ao álcool, adaptações diversas ao nível de neurônios ocorrem de modo a minimizar os efeitos do etanol (Tabakoff *et al.*, 1986). Esta adaptação pode envolver processos semelhantes à manutenção da homeostasia, definida por Himmelsbach (1941) e adaptada por Solomon e Corbit (1974) para explicar a tolerância aos opiáceos. De acordo com estes autores, adaptações contrárias ao efeito agudo da droga surgiriam de modo a restabelecer o equilíbrio e funcionamento do sistema nervoso. O conceito de homeostasia pode ser observado experimentalmente: após a exposição prolongada ao etanol, por exemplo, é possível verificar um aumento na densidade de

receptores NMDA, aumentando a atividade glutamatérgica no sistema nervoso e, conseqüentemente, reduzindo o efeito depressor do etanol (para uma revisão ver Kumari e Ticku, 2000). Na ausência do etanol, esta adaptação resultaria nos efeitos da síndrome de abstinência (Valenzuela, 1997). O processo homeostático, no entanto, não explica porque a tolerância ao etanol pode desenvolver-se para alguns efeitos do etanol e não para outros (Tabakoff e Kiianmaa, 1982). Também não explica como a tolerância pode ser interrompida ou revertida em certas situações, por exemplo, na presença de um estímulo ambiental novo (Siegel e Larson, 1996). Portanto um componente de aprendizado associativo (pavloviano) pode ser importante.

Nos últimos 20 anos diversos autores têm sugerido a influência do aprendizado na tolerância ao álcool. Foi observado que a prática de uma tarefa durante o estado de intoxicação (Vogel-Sprott *et al.*, 1984; Mayfield *et al.*, 1992; Khanna *et al.*, 1994) e a administração da droga sempre em um mesmo ambiente (Melchior e Tabakoff, 1981) facilitam a aquisição da tolerância. Além disso, drogas que prejudicam o aprendizado (por exemplo: antagonistas do receptor NMDA) também bloqueiam o desenvolvimento da tolerância (Khanna *et al.*, 1991, 1994, 2002; Wu *et al.*, 1993).

Além da diferenciação entre o mecanismo em que ocorre, a tolerância ao álcool etílico pode ser classificada em aguda, rápida ou crônica, de acordo com o tempo em que se desenvolve. Tolerância aguda refere-se à diminuição do efeito após uma única exposição ao álcool (Radlow, 1994). Tolerância rápida pode ser observada em uma segunda exposição, normalmente de 8 a 24 h após o término dos efeitos da primeira exposição (Khanna *et al.*, 1992; 1996). Já a tolerância crônica pode ser observada ao longo de dias ou semanas de exposição (Kalant, 1996; 1998). Não há consenso em torno da questão se o processo de

tolerância é um contínuo, da aguda para a crônica, ou se uma pode ocorrer sem a existência do outra (Khanna *et al.*, 1992; Silveri e Spear, 2004). Experimentalmente, no entanto, o processo de indução de tolerância crônica é trabalhoso e envolve uma carga significativa de estresse ao animal. Por isso, muitos pesquisadores têm utilizado o modelo de tolerância rápida como pré-determinante da tolerância crônica (Khanna *et al.*, 1991).

A multiplicidade de fatores que interagem na evolução da síndrome de dependência ao álcool deve ser levada em conta ao determinar-se fatores de risco para o alcoolismo. Schuckit (1994), ao abordar o alcoolismo como o consumo repetido e prejudicial de bebidas alcoólicas, pressupôs que qualquer fator capaz de contribuir para o consumo repetido poderia aumentar o risco de desenvolver dependência ao álcool. Desta forma, a partir de um estudo, demonstrou que indivíduos com baixa sensibilidade aos efeitos subjetivos do etanol, ou seja, que precisavam de doses maiores para obter os efeitos, apresentavam risco cerca de 75 % maior em tornarem-se dependentes de álcool, quando comparados ao grupo caracterizado pela alta sensibilidade aos efeitos do etanol.

A aquisição da tolerância ao etanol pode permitir ao indivíduo consumir doses maiores e potencialmente lesivas aos tecidos que não adquiriram tolerância, além de expor o indivíduo a períodos maiores de intoxicação que resultarão em alterações no sistema nervoso, síndrome de abstinência na ausência do álcool e maior tendência ao uso repetido (Koob, 2003).

Até o momento, os fármacos utilizados no tratamento do alcoolismo baseiam-se na redução dos efeitos reforçadores (naltrexona e acamprosato) ou na indução de efeitos desagradáveis (dissulfiram) resultantes do consumo de etanol (para uma revisão ver Kranzler, 2000). Como mencionado anteriormente, um possível mecanismo de ação da

naltrexona seja através do bloqueio de opióides endógenos liberados após a ingestão de bebidas alcoólicas. Quintanilla e Tampier (2000) observaram o bloqueio da tolerância aguda ao etanol após injeção de naltrexona em doses que reduzem o consumo em ratos UChB, que são geneticamente selecionados pelo alto consumo de etanol. Um mecanismo alternativo foi sugerido por estas pesquisadoras segundo o qual a naltrexona reduziria o consumo de etanol ao impedir o desenvolvimento da tolerância à ataxia causada pelo álcool. Por outro lado, até o momento não foi investigado o envolvimento das porções *core* e *shell* do núcleo *accumbens*, estruturas ricas em receptores opióides e supostamente envolvidas no mecanismo de supressão do consumo de etanol exercido pela naltrexona (Herz, 1997; Gonzales e Weiss, 1998), no desenvolvimento da tolerância ao álcool. Considerando estes fatos, o presente estudo procurou verificar papel do sistema opióide do núcleo *accumbens* no desenvolvimento de tolerância ao etanol em um modelo de tolerância rápida à incoordenação motora causada pela injeção sistêmica de etanol em ratos.

2. OBJETIVOS

2.1 *Objetivos gerais:*

O objetivo geral deste trabalho foi verificar a participação dos receptores opióides presentes no sistema nervoso central no desenvolvimento de tolerância rápida à incoordenação motora provocada pela injeção sistêmica de etanol, no modelo do plano inclinado em ratos Wistar machos.

2.2 *Objetivos específicos:*

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

a) Estudar o efeito de diferentes doses de naltrexona (antagonista opióide não-seletivo) injetadas por via sistêmica no desenvolvimento de tolerância rápida à incoordenação motora provocada por etanol.

b) Verificar o efeito da injeção local de naltrexona em diferentes doses nas porções *core* ou *shell* do núcleo *accumbens* no desenvolvimento de tolerância rápida à incoordenação motora provocada por etanol.

c) Verificar o efeito da injeção local de diferentes doses de antagonistas seletivos para os receptores do tipo μ_1 -, δ - e κ -opióides nas porções *core* ou *shell* do núcleo *accumbens* no desenvolvimento de tolerância rápida à incoordenação motora provocada por etanol.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1: *Animais.*

Foram utilizados ratos Wistar machos provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina, com três meses de idade e pesando entre 270 – 350 g. Os animais foram mantidos em gaiolas de polietileno branco (42 cm x 24 cm x 17 cm), 6 ratos por caixa, com água e ração *ad libitum*, temperatura controlada entre 23±2° C e ciclo de luz de 12 h (luzes acesas das 7:00 às 19:00 h). A fim de minimizar as variações circadianas, todos os experimentos foram conduzidos sempre entre 11:00 e 17:00 h. O manuseio dos animais seguiu as diretrizes da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento, e o protocolo experimental foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (protocolo n° 259/CEUA/UFSC, Proc. 23080.001030/2001-85).

3.2: *Drogas e reagentes.*

Etanol, cloridrato de morfina e hidrato de cloral foram obtidos da Merck (Hawthorne, NY, EUA). Pentobarbital sódico foi fornecido pelo Laboratório Abbott do Brasil (São Paulo, SP). Propilenoglicol, sacarose, sulfato de magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), hidróxido de sódio (NaOH), ácido acético glacial, formaldeído e azul de Evans foram obtidos da Vetec Química Fina Ltda. (Rio de Janeiro, RJ). Solução estéril de cloreto de sódio 0.9% foi obtida da Texon Ind. Farm. Ltda., (Viamão, RS). Cloridrato de naltrexona, cloridrato de naltrindol, cloridrato de naloxonazina e bicloridrato de norbinaltorfimina foram obtidos da Sigma Chemical Co. (Saint Louis, MO, EUA). O etanol foi

diluído em solução de cloreto de sódio 0,9 % estéril à concentração de 20 % m/v e administrado pela via intraperitoneal (i.p.) em volumes ajustados de acordo com o peso do animal. Naltrexona, morfina, naltrindol e nor-binaltorfimina foram dissolvidos em solução estéril de NaCl 0,9% nas concentrações desejadas. Naloxonazina foi dissolvida em solução contendo 0,9% NaCl e 1% ácido acético glacial com pH foi ajustado para 7.0 pela adição de NaOH 10 N. Todas soluções foram preparadas momentos antes dos experimentos. Para a histologia foram utilizados: bálsamo do Canadá sintético obtido da Soldan Prod. Citológicos Ltda. (Porto Alegre, RS), lâminas para microscopia (Normax Ltda. Portugal) e solução corante de Giemsa pronta para uso obtida da Laborclin Ind. Quim. Ltda. (Pinhais, PR).

3.3: Anestesia.

Momentos antes da cirurgia estereotáxica os animais foram anestesiados com pentobarbital e hidrato de cloral (Equitesin[®]). Este anestésico foi preparado no laboratório misturando vigorosamente uma solução ‘A’, contendo hidrato de cloral (8,5 g), MgSO₄.7H₂O (4,25 g) e água destilada (91,4 ml), com uma solução ‘B’ contendo pentobarbital sódico (1,94 g), etanol (13,0 ml) e propilenoglicol (85,6 ml). A cada animal foi administrado 0,3 ml/kg i.p. da mistura, sendo observada perda dos reflexos e total anestesia em torno de 5 min, perdurando por até 2 h.

3.4: Confeção das cânulas guia.

Cânulas foram confeccionadas a partir de tubos de aço Inox (Acerinox Ind. e Com. de Aço Inox SA., São Paulo – SP) com 0,7 mm de diâmetro. Os tubos foram serrados com

auxílio de uma lixa circular odontológica em exatos 13 mm de comprimento e a medida confirmada com um paquímetro (Vernier Caliper). A parte inferior da cânula (que era introduzida no cérebro) foi suavizada através de polimento, enquanto que na parte superior foram adicionadas ranhuras de modo a proporcionar maior adesão ao acrílico. Para prevenir a obstrução da cânula, foram confeccionados mandris de mesmo comprimento, que eram adaptados no interior da cânula após a cirurgia e removidos momentos antes do experimento. Um suporte para as cânulas foi feito a partir de dois tubos de aço com diâmetros diferentes, sendo o diâmetro do tubo mais fino semelhante ao diâmetro do lúmen das cânulas. Na luz do tubo maior inseriu-se o tubo mais fino, deixando uma sobra com 13 mm de comprimento onde, no momento da cirurgia, foram adaptadas as cânulas de 13 mm. O suporte, por sua vez, ficava acoplado ao braço móvel do aparelho estereotáxico permitindo o posicionamento da cânula de acordo com as coordenadas estereotáxicas.

3.5: Cirurgia estereotáxica.

Após a perda total dos reflexos realizou-se a tricotomia do campo cirúrgico e os animais foram adaptados ao aparelho estereotáxico (Stoelting Co, Wood Dale, IL, EUA). A assepsia foi feita com álcool iodado 1%, sendo em seguida injetado 0,1 ml de solução contendo lidocaína 3% e noradrenalina 1:50.000 (Probem Prod. Farm. Ltda., Catanduvas, SP) subcutaneamente na parte superior da cabeça. Depois de aproximadamente 30 s, com um bisturi, foi feito um corte com cerca de 1 cm de comprimento. O periósteo foi removido com tesoura, sendo o restante raspado com espátula e água oxigenada (10 vol). Com o auxílio de uma broca ortodôntica (n ° 6) foram feitos dois furos na calota craniana e, nestes, fixados os parafusos. Em seguida, uma cânula de 13 mm previamente confeccionada foi

adaptada ao suporte no braço do estereotáxico e posicionada sobre o encontro das suturas sagital e lambdóide (bregma). As medidas foram aferidas e a elas adicionadas as coordenadas referentes às porções *core* (AP +1,7 mm, ML \pm 1,8 mm e DV -6,0) ou *shell* (AP: +1.7 mm; ML: \pm 2.9 mm. DV: - 6.3 mm com um ângulo de 15 ° em relação ao plano sagital) do núcleo *accumbens* (Paxinos e Watson, 1997). Em cada experimento, metade das cânulas foi implantada do lado direito do cérebro e metade do lado esquerdo. Após mover o braço para a nova posição, a área imediatamente abaixo da cânula foi demarcada e um novo orifício perfurado. Neste orifício foi introduzida a cânula, sendo em seguida adicionado acrílico odontológico (Dental VIPI Ltda., Pirassununga, SP) para fixá-la aos parafusos. Após a secagem do acrílico, a cânula foi desconectada do braço estereotáxico e o mandril adaptado. Os animais foram mantidos em local aquecido até recuperação da anestesia e, posteriormente, removidos para gaiolas específicas (3 – 4 ratos por gaiola). Lá permaneceram com água e comida *ad libitum* e acompanhamento diário durante sete dias, quando foi então realizado o experimento comportamental.

3.6: *Teste do plano inclinado.*

O prejuízo motor foi avaliado no teste do plano inclinado (Arvola *et al.*, 1958) segundo método proposto por Quntanilla e Tampier (2000). O aparato consiste em uma plataforma retangular móvel recoberta por uma grade metálica, que se inclina de zero a 90° durante 5 s em velocidade angular constante. O animal é colocado sobre a grade com o focinho voltado para a parte de cima. Uma parede de acrílico transparente evita que o animal saia da plataforma e permite ao experimentador mensurar o ângulo de queda do

animal (figura 3). Este ângulo é posteriormente transformado no índice de prejuízo motor (%) de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Prejuízo motor (\%)} = \frac{\text{Basal} - a}{\text{Basal} - \alpha} \times 100$$

Onde: a = ângulo de queda do animal no momento do teste.

α = ângulo de queda de um animal anestesiado (aproximadamente 36°).

Basal = ângulo de queda antes do teste (normalmente 90°).

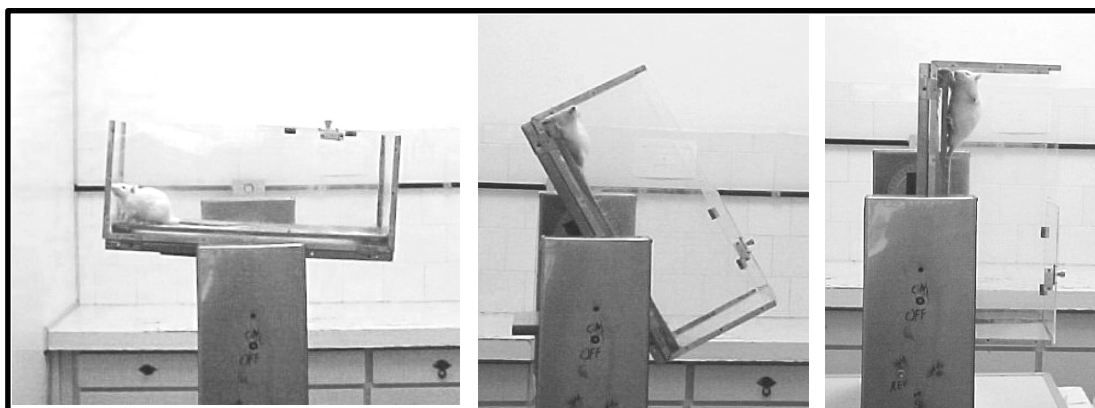


Figura 3: Teste do plano inclinado. O aparato consiste em uma grade metálica, que se inclina de zero a 90° em relação ao plano horizontal em 5 s. O ângulo de queda do animal foi aferido e transformado no índice de prejuízo motor. No exemplo acima está demonstrada a performance de um animal antes do experimento; observa-se que aos 90° de inclinação o animal permanece agarrado à grade metálica, indicando ausência de prejuízo motor (prejuízo motor = 0%).

3.7: Procedimentos experimentais

3.7.1: Experimento 1: efeito da naltrexona sobre a tolerância rápida ao etanol.

Após verificar o desempenho basal no plano inclinado, os animais foram divididos em dez grupos e pré-tratados com injeção intraperitoneal de naltrexona nas doses de 0,1;

0,3; 0,6; 1 e 3 mg/kg ou salina (5 grupos controle). Após 20 min, cada grupo foi subdividido em dois e tratados com etanol (2,7 g/kg 20% p/v i.p.) ou salina (n = 8-10). O prejuízo motor foi avaliado no teste do plano inclinado aos 30, 45, 60 e 75 min após o tratamento. Depois de 24 h todos os ratos receberam apenas etanol (2,7 g/kg i.p.) e foram novamente avaliados no plano inclinado. Doses das drogas foram selecionadas de experimentos prévios em nosso laboratório (Wazlawik e Morato, 2002; 2003) e da literatura (Holter e Spanagel, 1999; Coonfield *et al.*, 2002).

3.7.2: Experimento 2: efeito da co-administração de morfina e naltrexona sobre a tolerância rápida ao etanol.

Ratos Wistar receberam injeção intraperitoneal de naltrexona (0,3 mg/kg) ou salina, seguida imediatamente pela injeção de morfina (0,3 mg/kg i.p.) ou salina. Após 20 min cada um dos quatro grupos foi subdividido em dois e tratados com etanol (2,7 g/kg 20% p/v i.p.) ou salina, totalizando 8 grupos (n = 10). O prejuízo motor foi avaliado no teste do plano inclinado aos 30, 45, 60 e 75 min após o tratamento. Depois de 24 h todos os ratos receberam apenas etanol (2,7 g/kg i.p.) e foram novamente avaliados no plano inclinado.

3.7.3: Experimento 3: efeito da administração de antagonistas opióides nas porções core e shell do núcleo accumbens.

Após o período de recuperação da cirurgia, os animais foram avaliados no plano inclinado para verificar seu desempenho motor basal. Em seguida, foram divididos em dois grandes grupos, sendo o primeiro tratado com injeção intracerebral dos antagonistas opióides (naltrexona 5; 10 e 20 µg/0,3 µl, naltrindol 2 e 4 µg/0,5 µl, naloxonazina 2 e 4

$\mu\text{g}/0,3 \mu\text{l}$ e nor-binaltorfimina 2,5 e 5 $\mu\text{g}/0,3 \mu\text{l}$) ou veículo (0,3 μl). Injetores de 14 mm confeccionados a partir de tubos inox com 0,3 mm de diâmetro foram introduzidos através das cânulas. As drogas foram administradas com o auxílio de uma microseringa (Hamilton Co, 5 μl , Reno, NV, EUA) conectada a uma bomba de infusão (Modelo BI-2200, Insight, Ribeirão Preto – SP) durante 1 min. A infusão foi monitorada pelo deslocamento de uma bolha de ar no tubo de polietileno. Após a administração, o injetor foi deixado no local durante 1 min de modo a garantir a completa difusão do veículo. Depois de 5 min (exceto para o grupo tratado com naloxonazina), os grupos foram subdivididos e tratados com etanol (2,7 g/kg 20 % p/v i.p.) ou salina (n = 8-10). Nos animais pré-tratados com naloxonazina o tratamento com etanol foi administrado 3 h após o pré-tratamento, minimizando o efeito da ligação deste antagonista nos receptores δ - e κ -opióides (Hahn *et al.*, 1982; Tanda *et al.*, 1997). O prejuízo motor foi avaliado no plano inclinado aos 30, 45, 60 e 75 min após o tratamento. Depois de 24 h todos os ratos receberam apenas etanol (2,7 g/kg i.p.) e foram novamente avaliados no plano inclinado.

3.8: Perfusão e histologia.

Imediatamente após os experimentos, os animais foram anestesiados com Equitesin[®] e, através de uma agulha introduzida no ventrículo cardíaco esquerdo, perfundidos com solução de NaCl durante 10 min (aproximadamente 500 ml). Em seguida, foi infundida durante 5 min solução de formaldeído 4 % para fixar os órgãos. O ponto de injeção intracerebral foi marcado pela administração de 0,3 μl de azul de Evans através da cânula. Após a perfusão os cérebros foram removidos e pós-fixados em formaldeído 4 % durante 24 h. Transcorrida a pós-fixação, os cérebros foram transferidos para solução

contendo sacarose a 30 % durante 48 h (Cragg, 1980). Cortes coronais (50 µm) foram realizados em um micrótomo de congelamento (Sartorius-Werke, Goettingen, Alemanha), montados sobre lâminas de microscopia e imediatamente observados em um microscópio ótico para identificação do local marcado com azul de Evans. Para confecção das microfotografias, os cortes coronais foram feitos em um criostato (Leica Microsystems AG, Wetzlar, Alemanha), montados sobre lâminas de vidro para microscopia previamente gelatinizadas. Em seguida, as lâminas foram lavadas com água destilada e hidratadas durante 3 min em uma cuba contendo água destilada. Posteriormente, foram imersas em corante de Giemsa por 3 min e lavadas com água destilada. Em seguida, as lâminas foram imersas em água destilada por 1 min, álcool 70 % por 1 min, álcool 95 % por 1 min e três vezes imersas em álcool absoluto por 1 min. Posteriormente, as lâminas foram imersas em xilol por 5 min, este último procedimento foi repetido e então as lâminas foram cobertas com lamínulas e seladas com bálsamo do Canadá. Em seguida as lâminas coradas foram fotografadas em um microscópio ótico acoplado a sistema de captura de imagens (Olympus Co. modelo BX41, Melville, NY, EUA). Os cortes foram comparados com diagramas coronais obtidos do Atlas (Paxinos e Watson, 1997).

3.9: Análise estatística.

Nos experimentos 1 e 3, os ângulos de queda coletados nos dias 1 e 2 foram avaliados por análise de variância (ANOVA) de duas vias, sendo o pré-tratamento e o tratamento as variáveis independentes, e o prejuízo motor nos dias 1 e 2 as variáveis dependentes. No experimento 2 foi realizada a ANOVA de três vias tendo como variáveis independentes o pré-tratamento 1 (naltrexona ou salina), pré-tratamento 2 (morfina ou

salina) e tratamento (etanol ou salina), e como variáveis dependentes o prejuízo motor obtido nos dias 1 e 2. A análise *post-hoc* foi feita com o teste de Newman-Keuls, com nível de significância fixado em 5%. O programa Statistica[®] para Windows 6.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, EUA) foi utilizado na análise estatística. Os gráficos foram elaborados utilizando o programa Graph Pad Prism[®] 3.0 (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA). Para efeito de comparação com trabalhos anteriores, os dados experimentais estão apresentados como média do prejuízo motor \pm erro padrão da média (EPM).

4. RESULTADOS

A figura 4 representa o fenômeno da tolerância rápida ao etanol ao longo do tempo. Os resultados de dois grupos de 12 animais escolhidos ao acaso do experimento 1, e que não foram tratados com naltrexona, foram representados separadamente para demonstração da tolerância ao longo do tempo em cada sessão. No Dia 1 os animais foram tratados com salina ou etanol (2,7 g/kg 20% p/v i.p.) e testados no plano inclinado aos 30, 45, 60 e 75 min após a injeção. O grupo que recebeu salina não apresentou prejuízo motor. O grupo tratado com etanol apresentou prejuízo motor máximo normalmente por volta dos 30 min, com recuperação gradual ao longo do tempo, sendo que aos 75 min a maior parte dos animais não mais apresentou prejuízo motor.

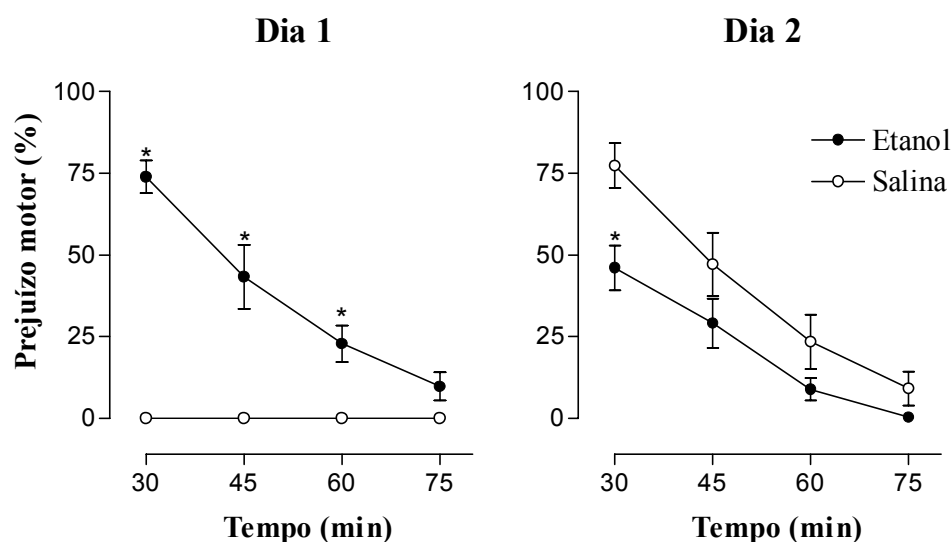


Figura 4: Tolerância rápida ao etanol ao longo do tempo. Pontos representam a média \pm EPM do prejuízo motor (% em relação à linha de base) em grupos de 12 animais escolhidos aleatoriamente do experimento 1. No Dia 1 apenas os animais tratados com etanol apresentaram prejuízo motor. No Dia 2 todos receberam álcool, e os animais tratados com etanol no Dia 1 apresentaram redução no prejuízo motor mais evidente após 30 min do tratamento, sugerindo desenvolvimento de tolerância rápida ao etanol. (*) $p < 0,05$ em relação ao controle em ANOVA seguida de teste de Newman-Keuls.

No Dia 2 todos os animais receberam a mesma dose de etanol (2,7 g/kg 20% p/v i.p.) e foram novamente testados. Neste dia, a tolerância ao álcool apresentou-se como uma redução do prejuízo motor nos animais tratados com etanol no Dia 1, que foi mais evidente após 30 min [$F_{(1,22)} = 8,571$; $p = 0,008$, efeito do tratamento em ANOVA com medidas repetidas]. Os animais tratados com salina no Dia 1, por sua vez, apresentaram prejuízo motor elevado com gradual recuperação ao longo do tempo.

Para facilitar a interpretação dos dados, considerou-se na análise estatística o prejuízo motor obtido 30 min após a injeção de álcool. Este parâmetro demonstrou confiabilidade e reprodutibilidade em uma série de experimentos prévios em nosso laboratório (Wazlawik e Morato, 2002; 2003; Wazlawik, 2003) e foi adotado nos experimentos seguintes, exceto quando explicitado.

4.1: Efeito da injeção sistêmica de naltrexona na tolerância rápida ao etanol.

A figura 5 ilustra o efeito da administração intraperitoneal de naltrexona na tolerância rápida ao etanol. No Dia 1 apenas os animais tratados com etanol apresentaram prejuízo motor significativo, demonstrado pela análise de variância do fator tratamento. A naltrexona *per se* não afetou a coordenação motora no Dia 1 na faixa de dose estudada ($p > 0,05$ na análise de variância do pré-tratamento, ver tabela 1 em anexo).

Ao receberem a segunda injeção de etanol no Dia 2, todos os grupos previamente tratados com SAL + etanol apresentaram redução no prejuízo motor (em torno de 40 %), que foi confirmada pela ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls ($p < 0,05$ em relação ao grupo controle), evidenciando tolerância aos efeitos do etanol. A naltrexona na dose de 0,1 mg/kg (figura 5, painel A) não afetou o desenvolvimento de tolerância rápida ao etanol (ver tabela 1 em anexo). Nas doses de 0,3 e 0,6 mg/kg (painéis B e C) a análise de variância

detectou interação significativa entre o pré-tratamento e o tratamento [$F_{(1,36)} = 9,336$; $p = 0,004$ e $F_{(1, 36)} = 4,116$; $p = 0,049$, doses de 0,3 e 0,6 mg/kg respectivamente]. Foi observado prejuízo motor elevado nos animais tratados com naltrexona + etanol. A análise *post hoc* confirmou o bloqueio da tolerância nesses grupos.

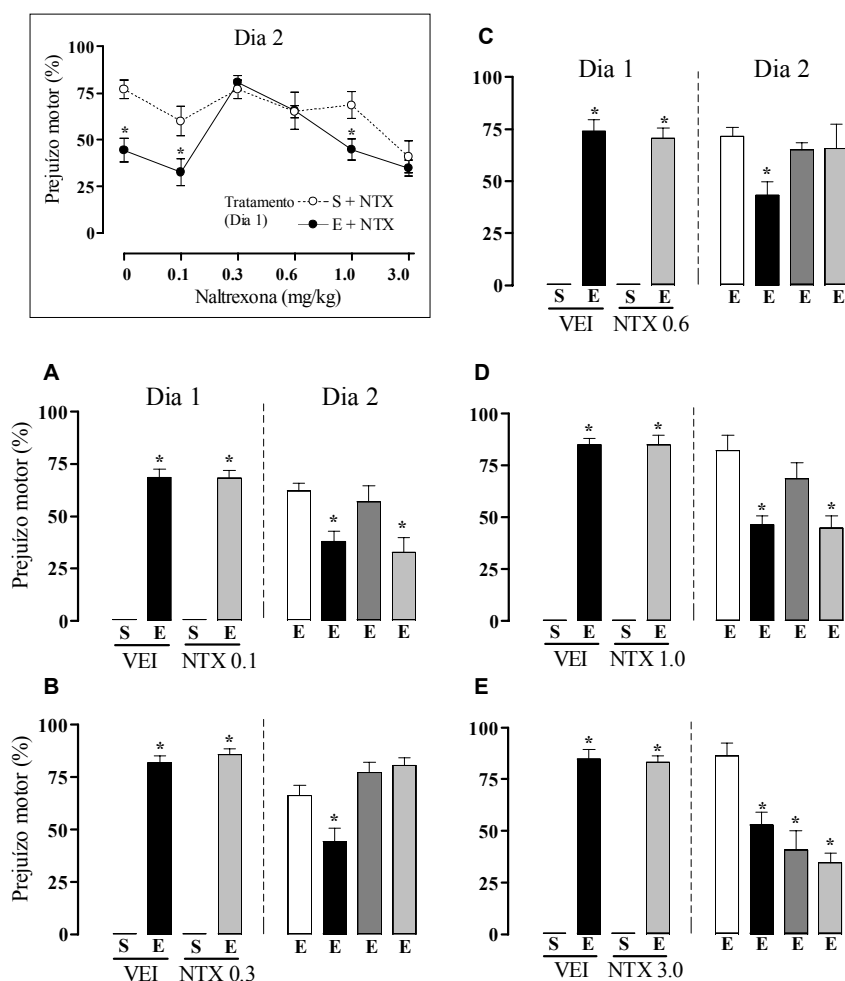


Figura 5: Efeito da injeção de naltrexona i.p. na tolerância rápida ao etanol. Barras representam a média do prejuízo motor \pm EPM (% em relação à linha de base) obtido 30 min após o tratamento ($n = 10$, exceto painel E, $n = 7$) nas doses de 0,1 (A), 0,3 (B), 0,6 (C), 1,0 (D) e 3,0 mg/kg (E) de naltrexona. (*) = $p < 0,05$ em relação ao controle (ANOVA seguida de teste de Newman-Keuls). *Em destaque:* resumo dos resultados obtidos no Dia 2 em relação à dose de naltrexona. Cada ponto representa a média \pm EPM do prejuízo motor obtido 30 min após o tratamento com diferentes doses de NTX. (*) = $p < 0,05$ em ANOVA seguida de Newman-Keuls.

As doses mais altas de naltrexona (1 e 3 mg/kg i.p.), representadas nos painéis D e E da figura 5, não bloquearam o desenvolvimento de tolerância rápida ao etanol (tabela 1). No Dia 2, entretanto, o grupo previamente tratado com NTX 3 mg/kg + SAL apresentou redução no prejuízo motor [$F_{(1, 24)} = 20,144$; $p > 0,001$, efeito do pré-tratamento].

Para verificar se a naltrexona interferiu com a tolerância rápida ao etanol ao longo do tempo foi realizada a análise estatística aos 30, 45, 60 e 75 min nos dias 1 e 2 para as doses de 0,3 e 0,6 mg/kg i.p. (figura 6). Como esperado, o efeito da naltrexona sobre a tolerância ao álcool só foi evidente aos 30 min ($p < 0,05$), sendo que nos demais tempos não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos.

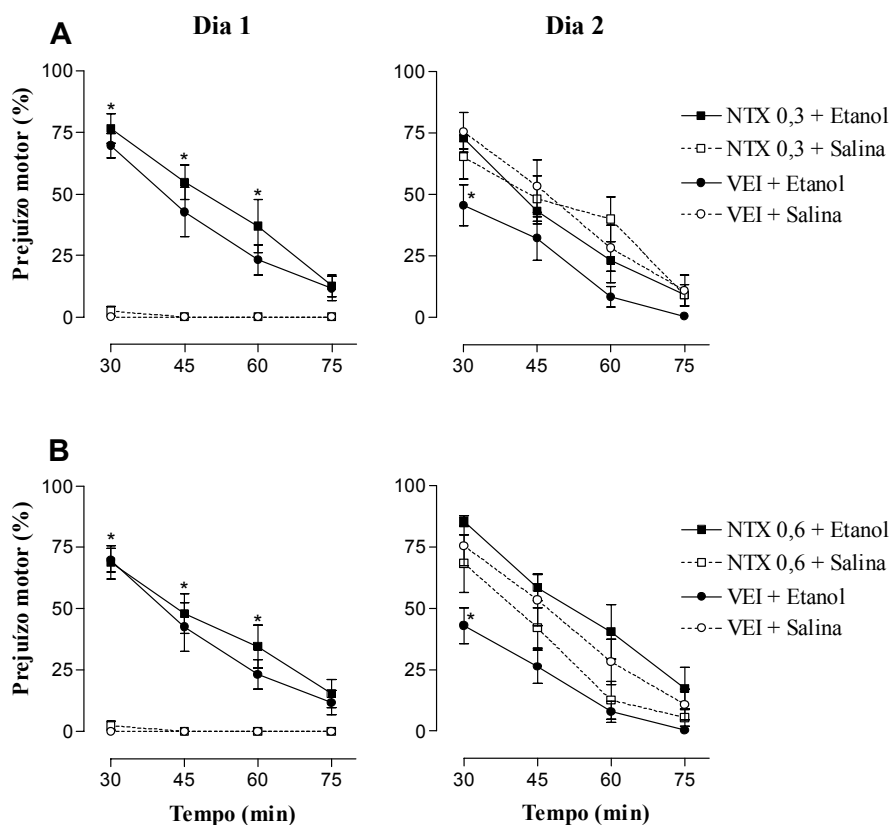


Figura 6: Efeito da naltrexona sobre a tolerância rápida ao longo do tempo. Pontos representam a média ± EPM do prejuízo motor (% em relação à linha de base) obtido em diferentes tempos após o tratamento em grupos de 10 animais nas doses de 0,3 (painel A) e 0,6 mg/kg (painel B). (*) $p < 0,05$ em relação ao respectivo controle em ANOVA seguida de teste de Newman-Keuls.

4.2: Efeito da co-administração sistêmica de naltrexona e morfina na tolerância rápida ao etanol.

A figura 7 representa os resultados obtidos com a co-administração i.p. de morfina e naltrexona. No Dia 1 apenas os animais que receberam etanol apresentaram prejuízo motor elevado [$F_{(1, 72)} = 642,7499$; $p < 0,001$]. A administração de naltrexona provocou um ligeiro, porém significativo, aumento no prejuízo motor provocado pelo etanol, observado na interação entre os tratamentos com naltrexona e etanol na análise de variância [$F_{(1,72)} = 4,492$ $p = 0,037$]. Apesar disso, nem a naltrexona, nem a morfina tiveram efeito *per se* no Dia 1 (tabela 2 em anexo).

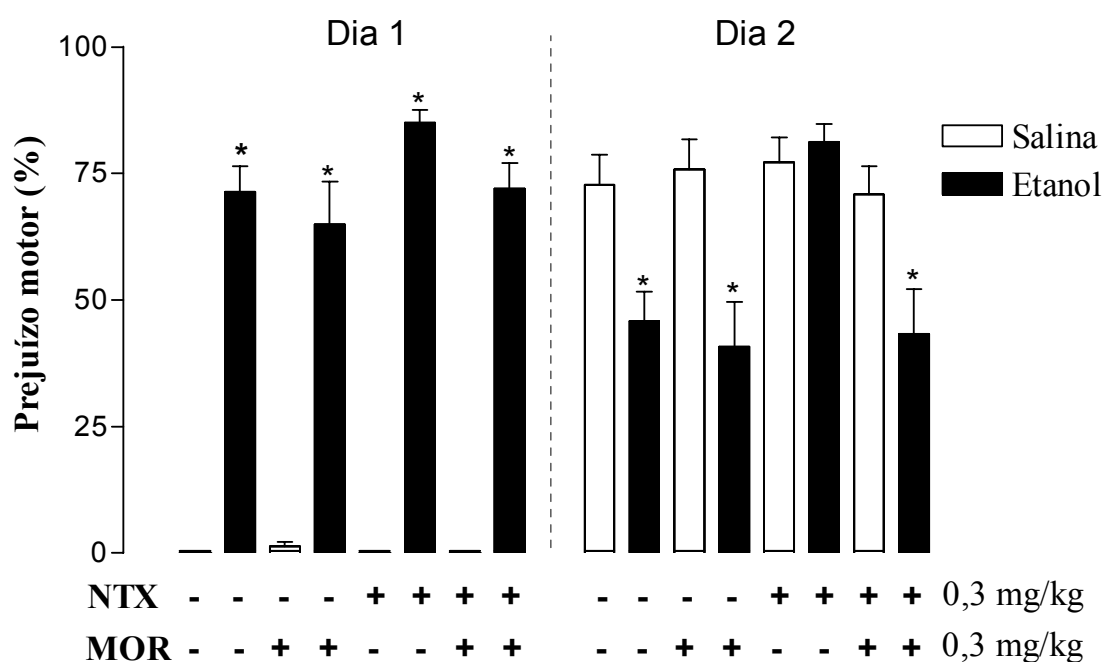


Figura 7: Efeito da co-administração de naltrexona (0,3 mg/kg) e morfina (0,3 mg/kg) na tolerância rápida ao etanol. Barras representam a média do prejuízo motor \pm EPM obtido 30 min após o tratamento (% em relação à linha de base) em grupos de 10 animais. Barras claras referem-se aos animais tratados com salina no Dia 1, barras escuras referem-se aos animais tratados com etanol. A presença ou ausência de NTX ou MOR está assinalada sob cada barra: (+) presença; (-) ausência. (*) $p < 0,05$ em relação ao respectivo controle em ANOVA seguida de Newman-Keuls.

No Dia 2, confirmando os resultados anteriores, a administração prévia de naltrexona (0,3 mg/kg i.p.) bloqueou o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol [$F_{(1, 72)} = 4,247$; $p = 0,042$, interação naltrexona *versus* etanol]. A co-administração de morfina preveniu o efeito da naltrexona na tolerância rápida ao etanol observada pela ausência de interação entre os pré-tratamentos e o tratamento [$F_{(1, 72)} = 2,176$; $p = 0,144$; interação naltrexona x morfina x etanol, ver tabela 2]. Além disso, a morfina nesta dose mostrou-se incapaz de interferir com o desenvolvimento de tolerância rápida ao etanol, quando administrada isoladamente ($p > 0,05$ em relação ao controle; teste de Newman-Keuls).

4.3: Efeito dos antagonistas opióides seletivos administrados nas porções core ou shell do núcleo accumbens sobre a tolerância rápida ao etanol.

As figuras 8 a 12 representam os resultados obtidos com a administração dos antagonistas opióides nas porções *core* ou *shell* do núcleo *accumbens*. Em todos os experimentos as administrações intracerebrais do veículo ou dos antagonistas (exceto nornaltorfimina na dose de 5 µg na porção *core*, que será comentada adiante) não afetaram o prejuízo motor no Dia 1, sendo observado neste dia apenas o prejuízo motor causado pelo etanol (valores de F e p encontram-se nas tabelas 1 e 3 em anexo). Da mesma forma como ocorrido nos experimentos em que as drogas foram administradas por via i.p., os animais tratados com veículo + etanol apresentaram redução no prejuízo motor em relação ao controle no Dia 2, evidenciando o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol. A microinjeção dos antagonistas, no entanto, provocou efeitos diferenciados que serão detalhados a seguir.

A microinjeção de naltrexona na porção *shell* do núcleo *accumbens* (figura 8) nas doses de 10 e 20 µg preveniu o desenvolvimento de tolerância ao etanol, como demonstrou

a análise de variância [$F_{(1, 32)} = 4,556$; $p = 0,040$ e $F_{(1, 34)} = 5,757$; $p = 0,022$, interação pré-tratamento *versus* tratamento nas doses de 10 e 20 μg respectivamente].

Na porção *core* (figura 9) os resultados mostraram um efeito da naltrexona semelhante ao obtido na *shell*. No entanto, houve bloqueio estatisticamente significativo da tolerância apenas com a microinjeção de 20 μg de naltrexona [$F_{(1, 33)} = 7,219$; $p = 0,011$, interação pré-tratamento *versus* tratamento].

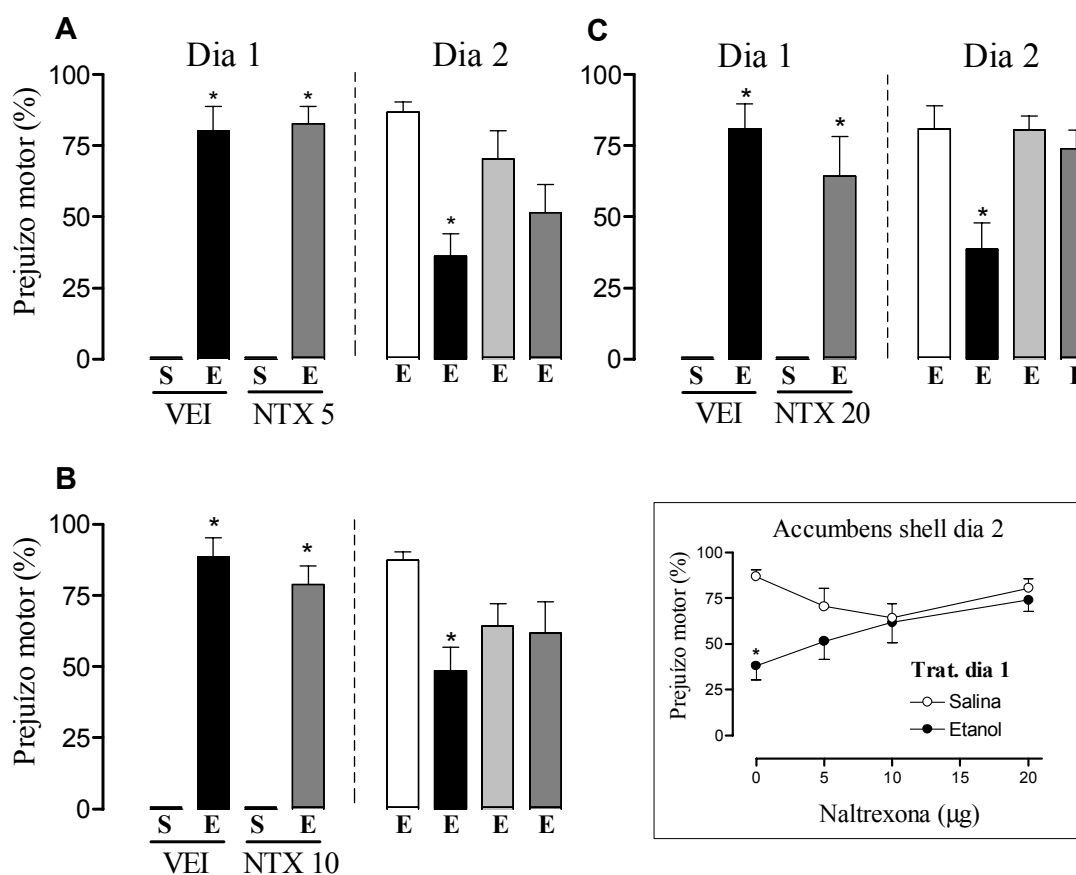


Figura 8: Efeito da microinjeção de naltrexona (NTX) na porção *shell* do núcleo *accumbens* sobre a tolerância rápida ao etanol. Barras representam a média \pm EPM do prejuízo motor (%) em relação à linha da base obtido 30 min após o tratamento ($n = 8-10$) nas doses de 5 (A), 10 (B) e 20 μg (C). (*) = $p < 0,05$ em relação ao controle em ANOVA seguida de Newman-Keuls. *Em destaque:* resumo dos resultados obtidos no Dia 2 em relação à dose de naltrexona. Cada ponto representa a média \pm EPM do prejuízo motor obtido 30 min após o tratamento com diferentes doses de NTX. (*) = $p < 0,05$ em ANOVA seguida de Newman-Keuls.

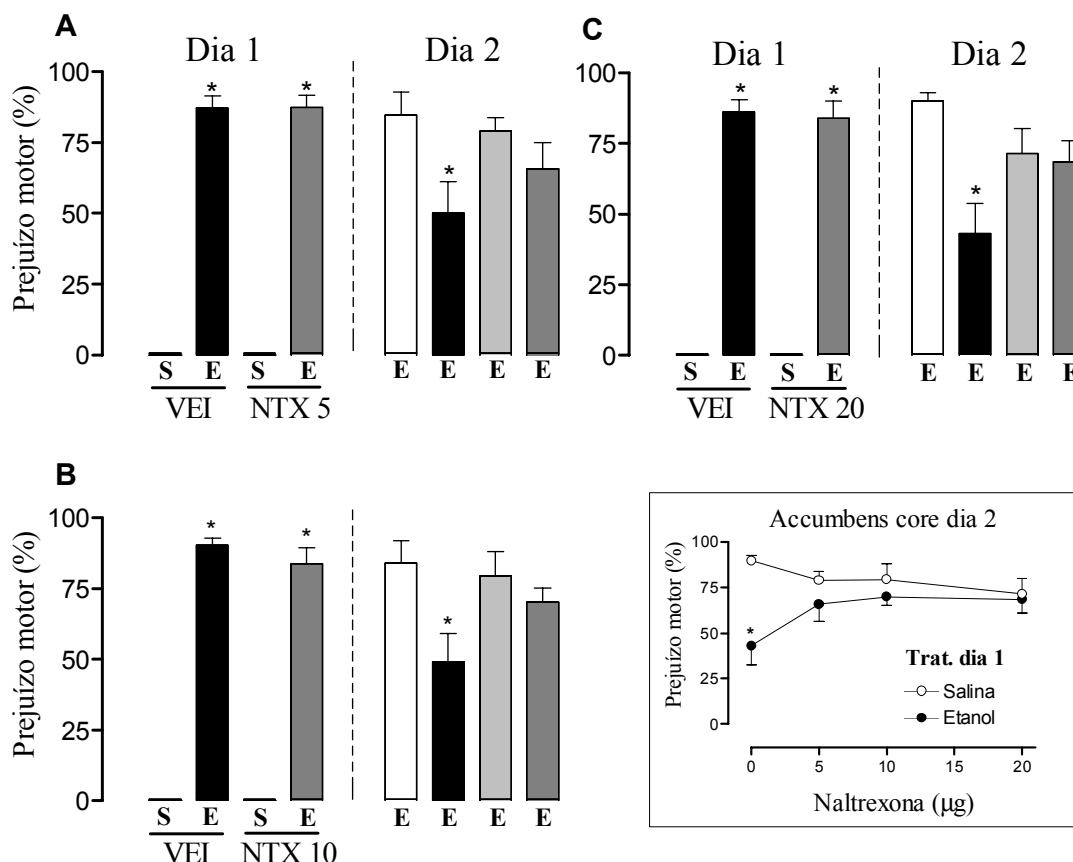


Figura 9: Efeito da microinjeção de naltrexona (NTX) na porção *core* do núcleo *accumbens* sobre a tolerância rápida ao etanol. Barras representam a média \pm EPM do prejuízo motor (% em relação à linha da base) obtido 30 min após o tratamento ($n = 8-10$) nas doses de 5 (A), 10 (B) e 20 μg (C). (*) = $p < 0,05$ em relação ao controle em ANOVA seguida de Newman-Keuls. *Em destaque:* resumo dos resultados obtidos no Dia 2 em relação à dose de naltrexona. Cada ponto representa a média \pm EPM do prejuízo motor obtido 30 min após o tratamento com diferentes doses de NTX. (*) = $p < 0,05$ em ANOVA seguida de Newman-Keuls.

Os efeitos da administração de naloxonazina, antagonista do receptor μ -opióide, nas porções *shell* e *core* do núcleo *accumbens* está representado na figura 10. No Dia 2, observa-se que os grupos tratados no Dia 1 com naloxonazina na dose de 4 μg , tanto na porção *shell* quanto na porção *core*, apresentaram prejuízo motor semelhante ao dos grupos tratados com veículo nessas estruturas, sugerindo o bloqueio da tolerância rápida ao etanol

[$F_{(1, 36)} = 4,854$; $p = 0,038$ para *shell* e $F_{(1, 36)} = 4,658$; $p = 0,038$ para *core*, interação do pré-tratamento *versus* tratamento].

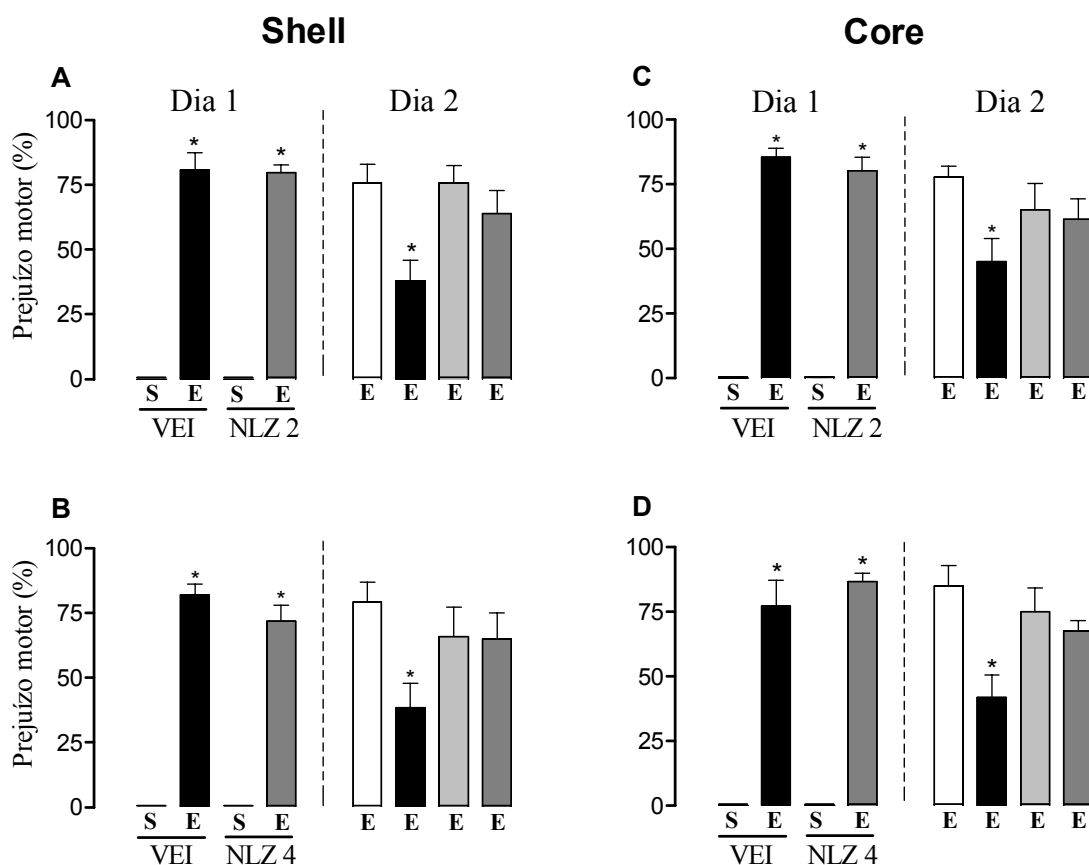


Figura 10: Efeito da microinjeção do antagonista μ -opióide naloxonazina (NLZ) nas porções *shell* (painéis A e B) ou *core* (painéis C e D) do núcleo *accumbens* sobre a tolerância rápida ao etanol. Barras representam a média \pm EPM do prejuízo motor (% em relação à linha de base) obtido 30 min após o tratamento ($n = 10$) nas doses de 2 (A e C) ou 4 μ g (B e D). (*) = $p < 0,05$ em relação ao controle em ANOVA seguida de Newman-Keuls.

O efeito da administração do naltrindol, antagonista do receptor δ -opióide, nas porções *shell* ou *core* do núcleo *accumbens* está representado na figura 11. Os grupos tratados com naltrindol em ambas as porções do núcleo *accumbens* e etanol por via

sistêmica, ao serem testados no Dia 2, apresentaram prejuízo motor semelhante ao dos grupos tratados com veículo e etanol (para valores de F e p ver tabela 3 em anexo). Assim, nas doses empregadas, o naltrindol não afetou o desenvolvimento da tolerância rápida, que pode ser confirmada após análise *post hoc* como redução do prejuízo motor no Dia 2 ($p < 0,05$ em relação ao controle no teste de Newman-Keuls).

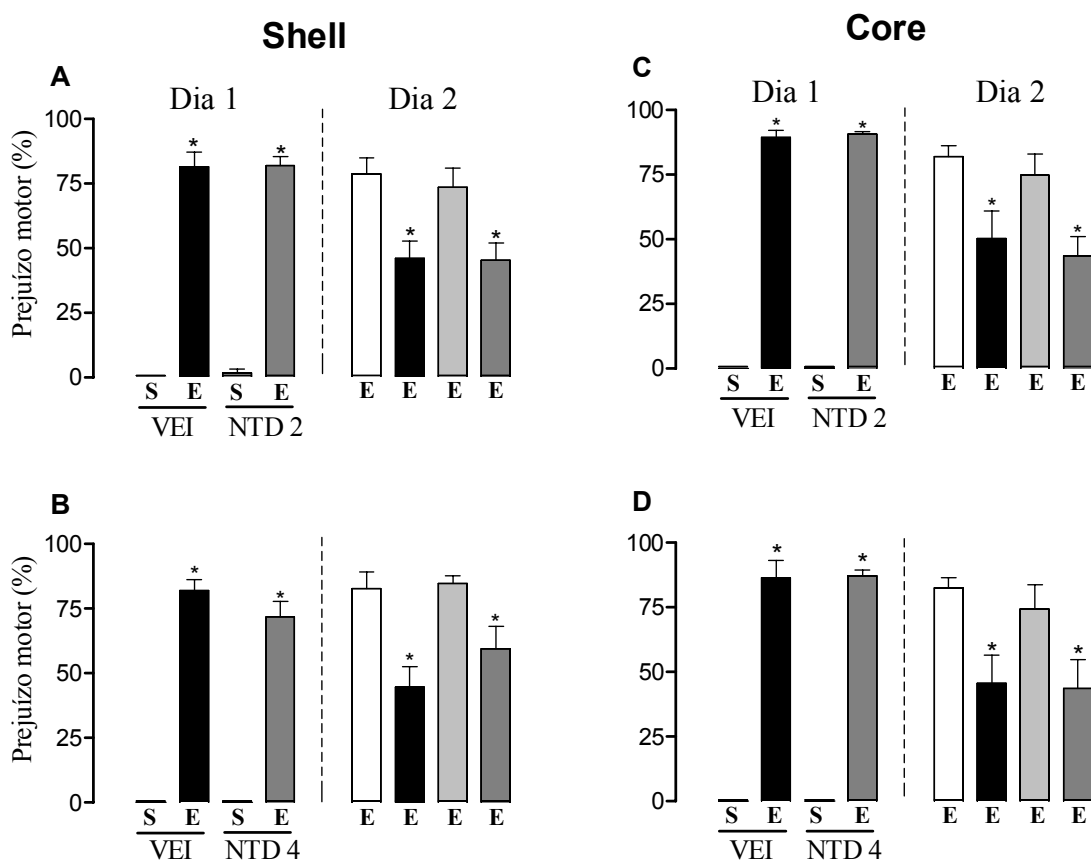


Figura 11: Efeito da microinjeção do antagonista δ -opióide naltrindol (NTD) nas porções *shell* (painéis A e B) ou *core* (painéis C e D) do núcleo *accumbens* sobre a tolerância rápida ao etanol. Barras representam a média \pm EPM do prejuízo motor (% em relação à linha de base) obtido 30 min após o tratamento ($n = 10$) nas doses de 2 (A e C) ou 4 μ g (B e D). (*) = $p < 0,05$ em relação ao controle em ANOVA seguida de Newman-Keuls.

A figura 12 representa os efeitos da nor-binaltorfimina, antagonista dos receptores κ -opióides, injetada nas porções *shell* ou *core* do núcleo *accumbens*. Os grupos tratados com nor-binaltorfimina na porção *shell* do núcleo *accumbens* (painéis A e B da figura 12) não apresentaram diferenças em relação aos grupos que receberam veículo no Dia 1 (ver tabela 3). Assim, não houve diferença entre os animais tratados com a droga ou veículo independentemente do fato de terem recebido etanol ou salina. Além disso, o antagonista nas doses de 2,5 e 5 μ g, não parece ter alterado o desenvolvimento de tolerância, observada no Dia 2 como uma redução no prejuízo motor nos grupos tratados previamente com etanol ($p < 0,05$ em relação ao controle, teste de Newman-Keuls).

Na porção *core* (painéis C e D da figura 12), a microinjeção de 2,5 μ g de nor-binaltorfimina não alterou o padrão de respostas em relação aos animais controles no Dia 1 (ver tabela 3). No Dia 2 a análise de variância detectou efeito significativo do tratamento [$F_{(1,34)} = 5,169$; $p = 0,029$], mas falhou em detectar interação significativa entre o pré-tratamento *versus* tratamento [$F_{(1,34)} = 3,759$, $p = 0,061$]. A dose de 5 μ g de nor-binaltorfimina afetou o desempenho dos animais no Dia 1, observado pelo efeito significativo do pré-tratamento com nor-binaltorfimina [$F_{(1,36)} = 8,902$; $p = 0,005$], apesar disso, a análise de variância não detectou interação significativa entre o pré-tratamento e o tratamento no Dia 1 (ver tabela 3). No Dia 2 foi observada redução no prejuízo motor semelhante nos grupos tratados com nor-binaltorfimina + etanol, nor-binaltorfimina + salina e veículo + etanol, sugerindo que a tolerância rápida ao etanol se desenvolveu nestes três grupos [$F_{(1,36)} = 14,036$; $p < 0,001$; interação do pré-tratamento *versus* tratamento].

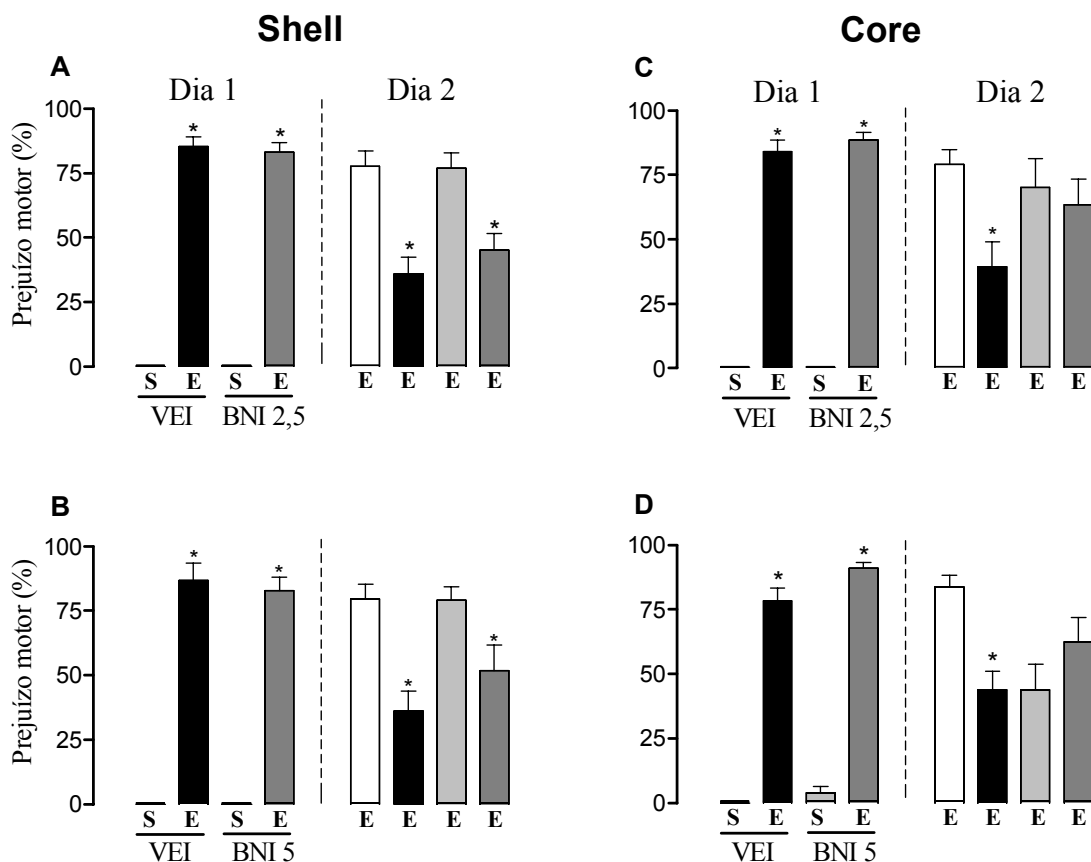


Figura 12: Efeito da microinjeção do antagonista κ -opióide nor-binaltorfimina (BNI) nas porções *shell* (painéis A e B) ou *core* (painéis C e D) do núcleo *accumbens* sobre a tolerância rápida ao etanol. Barras representam a média \pm EPM do prejuízo motor (% em relação à linha de base) obtido 30 min após o tratamento ($n = 10$) nas doses de 2 (A e C) ou 4 μ g (B e D). (*) = $p < 0,05$ em relação ao controle em ANOVA seguida de Newman-Keuls.

A análise estatística detalhada de todos os experimentos pode ser conferida nas tabelas 1 a 3 em anexo. A figura 13 representa os pontos de injeção verificados após a histologia dos cérebros. Ratos onde a cânula não foi implantada corretamente nas porções *core* ou *shell* do núcleo *accumbens* não foram incluídos na análise estatística.

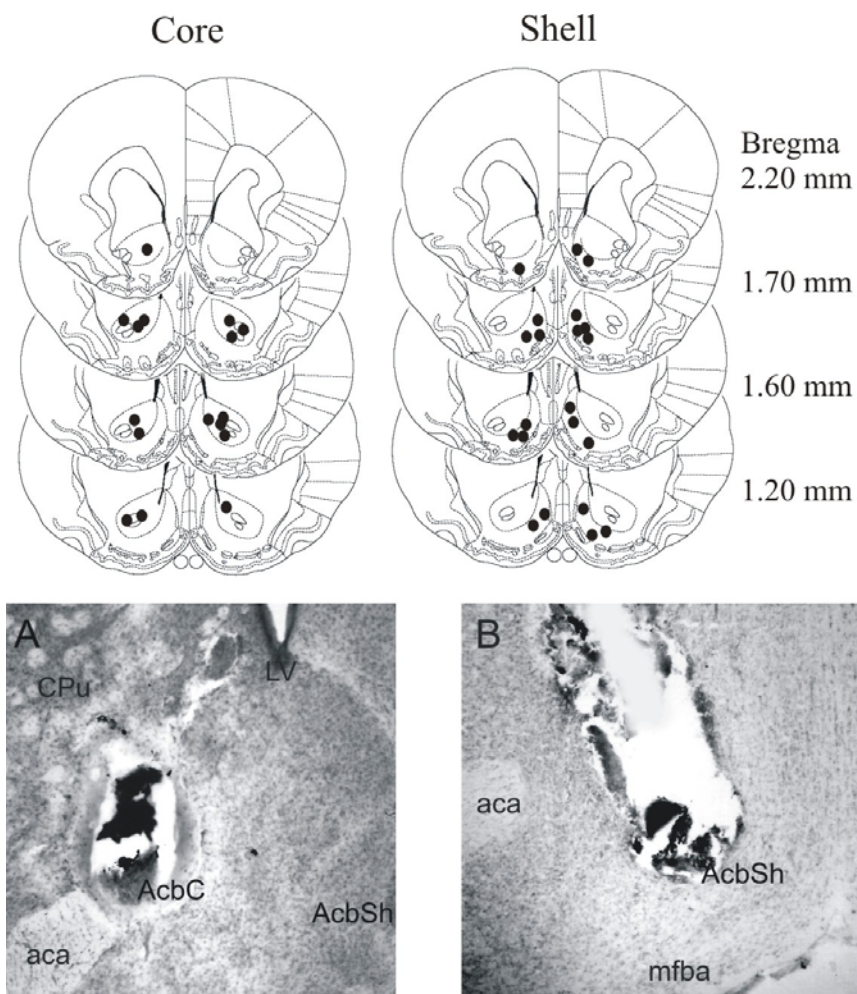


Figura 13: Diagramas coronais representando o local das microinjeções nas porções *core* ou *shell* do núcleo *accumbens*. Devido à superposição dos pontos de injeção o número aqui representado é menor que o observado experimentalmente. A: microfotografia da injeção na porção *core* do *accumbens*. B: microfotografia da injeção na porção *shell*. LV: ventrículo lateral; Cpu: caudado putamen; aca: comissura anterior; mfba: *medium forebrain bundle*; AcbC: *accumbens core*; AcbSh: *accumbens shell*. (diagramas de Paxinos e Watson, 1997).

5. DISCUSSÃO

O estudo da tolerância ao álcool tem sido abordado de diversas maneiras, uma vez que este é um fenômeno complexo e que pode envolver mecanismos diferentes de acordo com o efeito observado. Pelo fato de ocorrerem alterações no metabolismo do álcool, muitos autores preocupam-se com o estudo dos fatores que levam à adaptação metabólica do organismo com relação a esta droga (Alderman *et al.*, 1989; Lieber, 1999; 2004). Outros procuram estudar as mudanças relacionadas aos receptores onde esta droga atua, procurando justificar as alterações comportamentais decorrentes do uso crônico de álcool (Kalant, 1998; Fadda e Rossetti, 1998). Quanto ao período de desenvolvimento no qual estas alterações acontecem, como já mencionado, a tolerância ao álcool tem sido estudada após uma única exposição (aguda), após a segunda exposição (rápida) ou após várias exposições ao álcool (crônica). Embora atualmente não seja possível afirmar se o desenvolvimento de tolerância é um processo contínuo, vários trabalhos da literatura têm mostrado semelhanças entre estes três tipos de tolerância ao álcool, sugerindo que o desenvolvimento de tolerância rápida possa prever características da tolerância crônica (Khanna *et al.*, 1991; 1992). O paradigma da tolerância rápida empregado no presente estudo é conveniente porque os efeitos de drogas seletivas para determinados sistemas de neurotransmissores e/ou receptores podem ser estudados no segundo dia de teste.

Nos experimentos aqui mostrados, a injeção intraperitoneal de 2,7 g/kg de etanol induziu tolerância rápida ao etanol no Dia 2, confirmando estudos prévios em nosso laboratório (Wazlawik e Morato, 2002; 2003; Wazlawik, 2003). Após a administração de etanol, os animais mostraram um prejuízo motor elevado com recuperação gradual ao longo do tempo. A tolerância observada no Dia 2 foi mais evidente após 30 min, mas também pode ser detectada aos 45 min. No entanto, os valores obtidos aos 30 min apresentaram maior reprodutibilidade e confiabilidade

e por isso foram considerados em todos os experimentos. Embora a análise estatística tenha sido feita nos dados brutos (ângulos de queda), o índice de prejuízo motor no plano inclinado (em porcentagem) foi usado na representação gráfica dos resultados para efeito de comparação com os trabalhos anteriores desenvolvidos pelo nosso (Wazlawik e Morato, 2002; 2003) e outros laboratórios (Khanna *et al.*, 1996; 1997; 1998; Quintanilla e Tampier, 2000).

A injeção sistêmica de naltrexona nas doses de 0,3 e 0,6 mg/kg prejudicou o desenvolvimento de tolerância rápida ao etanol, enquanto que nas doses de 0,1 e 1 mg/kg não foram observadas alterações significativas. Além disso, a co-administração de uma dose baixa de morfina (0,3 mg/kg), sem provocar prejuízo motor *per se* ou afetar a tolerância ao etanol, impediu o efeito da injeção de 0,3 mg/kg de naltrexona na tolerância ao álcool. Isto sugere que o efeito da naltrexona nas doses intermediárias usadas se deva à ligação específica aos receptores opióides. Por outro lado, o fato de somente as doses intermediárias de naltrexona terem produzido bloqueio claro da tolerância rápida ao etanol sugere que a curva dose-resposta da naltrexona seja uma curva em forma de ‘U’ invertido. O bloqueio da tolerância rápida ao etanol pela injeção sistêmica de naltrexona está de acordo com dados demonstrados por Quintanilla e Tampier (2000) para a tolerância aguda ao etanol em ratos UChB. Contudo, em outro estudo a administração de naloxona, outro antagonista opióide não-seletivo, não afetou a tolerância crônica ao etanol (Miceli *et al.*, 1980). Diferenças metodológicas ou na faixa de doses escolhidas podem explicar, em parte, os resultados conflitantes encontrados nestes trabalhos.

A naltrexona poderia ter bloqueado a tolerância por produzir algum efeito na coordenação motora dos animais no Dia 1. Entretanto, isso parece improvável, já que a performance motora no plano inclinado dos animais tratados com naltrexona e seus respectivos controles foi semelhante. Outro aspecto que poderia contribuir para o bloqueio da tolerância seria um efeito da naltrexona

no metabolismo do álcool. No entanto, há dados da literatura mostrando que a concentração sanguínea de álcool não parece ser influenciada pelo pré-tratamento com naltrexona (Linseman e Le, 1997), sugerindo que o efeito da naltrexona na tolerância ao álcool não se deva a uma interação farmacocinética entre estas duas drogas. Embora no presente estudo não tenham sido dosados os níveis sanguíneos de álcool dos animais, outros estudos têm sugerido que a tolerância rápida se deve principalmente a fatores farmacodinâmicos (Khanna *et al.*, 1991; Quertemont *et al.*, 2003).

Por outro lado, um resultado não esperado foi observado nos grupos tratados com a dose mais alta de naltrexona (3,0 mg/kg i.p.), que mostraram um baixo prejuízo motor no Dia 2. Este efeito foi estatisticamente significativo tanto nos animais tratados no Dia 1 com naltrexona + salina, quanto nos tratados com naltrexona + etanol (quando comparados com o grupo que recebeu veículo + salina). O fato do grupo tratado com naltrexona + salina ter apresentado reduzido prejuízo motor quando exposto ao álcool no Dia 2 poderia sugerir o desenvolvimento de tolerância cruzada entre naltrexona e álcool. Tal tolerância entre etanol e agonistas opióides, como a morfina, já foi mostrada em estudos anteriores (por exemplo: Khanna *et al.*, 1979; Le *et al.*, 1980; Brick e Horowitz, 1983; Jorgensen *et al.*, 1986), mas apesar da naltrexona ter mostrado atividade agonista *in vitro*, isto só acontece em concentrações muito elevadas, incompatíveis com concentrações alcançadas *in vivo* (Vizi *et al.*, 1976). Ainda, o surgimento de tolerância cruzada não pode ser explicado por um efeito da naltrexona *per se* na coordenação motora, como é observado com a maioria das drogas que produzem tolerância cruzada com o etanol (para alguns exemplos ver: Khanna *et al.*, 1992; Neznanova *et al.*, 2000; da Silva *et al.*, 2001), pois não houve prejuízo motor nos grupos tratados com naltrexona no Dia 1. Um possível mecanismo para este resultado talvez seja a facilitação da expressão da denominada *tolerância por uma exposição* (*one*

trial tolerance, ver File *et al.*, 1990; Dawson *et al.*, 1994; Bertoglio e Carobrez, 2002), observada pela diminuição do efeito de uma droga após exposição prévia somente ao modelo experimental. Além disso, em estudos utilizando antagonistas seletivos para os receptores opióides foram observadas discrepâncias entre os efeitos do bloqueio dos receptores μ - e δ - opióides e o antagonismo do receptor κ -opióide (Honkanen *et al.*, 1996; Lindholm *et al.*, 2001; Ciccocioppo *et al.*, 2002). Como mencionado anteriormente, a localização do receptor κ -opióide é predominantemente pré-sináptica e sua ativação produz efeitos geralmente antagônicos aos efeitos da ativação dos receptores μ - e δ - opióides (McFadzean *et al.*, 1987; Hjelmstad e Fields, 2001; para uma revisão ver Bodnar e Klein, 2004). Como a naltrexona é um antagonista não-seletivo, mas com maior afinidade para os sub-tipos de receptores opióides μ - e κ - e menor para o subtipo δ - (Gutstein e Akil, 2001) é possível que a diferença do efeito da naltrexona nas diversas doses aqui observada deva-se à ligação diferenciada da naltrexona nesses subtipos de receptores.

Um dado relevante deste estudo foi que diferentes doses de naltrexona microinjetadas nas porções *core* ou *shell* do núcleo *accumbens* bloquearam o desenvolvimento de tolerância rápida ao etanol. Quando injetada na porção *core* do *accumbens* apenas a dose de 20 μ g de naltrexona promoveu bloqueio significativo da tolerância ao etanol, enquanto que, quando injetada na porção *shell*, o bloqueio significativo foi observado nas doses de 10 e 20 μ g. Isso poderia sugerir que a porção *shell* é mais sensível aos efeitos da naltrexona. No entanto, observando as curvas, nota-se que os resultados obtidos nas duas porções do núcleo *accumbens* são semelhantes e que talvez as diferenças tenham sido observadas porque cada dose foi analisada em separado, não tendo sido feitas comparações entre as mesmas. Estudos recentes enfocando a ação diferenciada das drogas de abuso nas porções *core* ou *shell* do núcleo *accumbens* demonstraram que a porção *shell* parece estar mais envolvida com as fases iniciais do consumo e do comportamento de busca por estas

substâncias, enquanto que a porção *core* aparentemente desempenha um papel mais importante nos processos de condicionamento associados ao comportamento de consumo de drogas (Ito *et al.*, 2000; 2004). Com relação ao álcool, especificamente, apesar de diversos estudos demonstrarem alterações predominantemente na porção *shell* (para uma revisão ver Di Chiara, 2002; Gonzales *et al.*, 2004) os efeitos podem variar de acordo com a metodologia empregada e o momento da coleta dos dados. Por exemplo, a administração intragástrica de etanol mostrou ativar igualmente o sistema opióide nas porções *core* e *shell* em uma linhagem de ratos selecionada pela alta preferência ao etanol (Li *et al.*, 1998), embora o consumo oral voluntário de etanol promova aumento localizado no metabolismo de glicose na porção *shell*, mas não na porção *core* (Porrino *et al.*, 1998). Desta forma não surpreende que os efeitos da microinjeção de naltrexona nas porções *core* ou *shell* do núcleo *accumbens* sobre a tolerância ao etanol tenham sido similares. Mesmo assim, a hipótese de que a droga tenha se difundido a partir do local de infusão para estruturas adjacentes não pode ser completamente descartada.

Para identificar qual(is) subtipo(s) de receptores opióides estaria(m) envolvido(s) no bloqueio da tolerância pelo antagonista opióide, nos experimentos subseqüentes empregaram-se antagonistas seletivos para os receptores μ -, δ - e κ -opióides, naloxonazina, naltrindol e nornaltorfimina, respectivamente (Hahn *et al.*, 1982; Portoghese *et al.*, 1987; 1988). Esses experimentos mostraram resultados diversos. A naloxonazina, antagonista μ -opióide, microinjetada na dose de 4 μ g, tanto na porção *shell* como na porção *core*, bloqueou o desenvolvimento de tolerância ao álcool, sugerindo que pelo menos parte do bloqueio da tolerância rápida pela naltrexona é devida ao bloqueio de receptores do tipo μ -opióide no núcleo *accumbens*.

A microinjeção do antagonista κ -opióide nor-binaltorfimina na porção *core*, por sua vez, promoveu efeitos diferenciados. Na dose mais baixa (2,5 μ g) houve tendência ao bloqueio da tolerância rápida ao etanol (interação do tratamento *versus* pré-tratamento: $p = 0.06\%$), enquanto que na dose mais alta observou-se redução no prejuízo motor do grupo tratado com nor-binaltorfimina + salina, um efeito semelhante àquele observado com naltrexona administrada por via sistêmica na dose maior, sugerindo uma facilitação do fenômeno de tolerância por uma exposição. A nor-binaltorfimina na dose de 5 μ g na porção *core* promoveu ainda um efeito *per se* no Dia 1. Uma possível explicação para o efeito diferenciado da nor-binaltorfimina seria a localização pré-sináptica do receptor κ -opióide no núcleo *accumbens* (McFadzean *et al.*, 1987; Hjelmstad e Fields, 2001). A microinjeção de nor-binaltorfimina na porção *shell* do núcleo *accumbens* não afetou o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, sugerindo que os receptores κ -opióides presentes nesta estrutura não desempenhem um papel relevante na modulação da tolerância.

A microinjeção do antagonista δ -opióide naltrindol nas duas porções do núcleo *accumbens* não apresentou qualquer efeito significativo na tolerância, pelo menos nas doses aqui empregadas, sugerindo que este subtipo de receptor opióide não contribua para o bloqueio da tolerância produzido pela naltrexona.

Os resultados deste estudo sugerem que o sistema opióide, em particular através de receptores do tipo μ , tem fisiologicamente um papel modulador positivo no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, já que seu bloqueio prejudica o desenvolvimento da tolerância, efeito que é revertido por um agonista opióide. No entanto, com estes resultados, não podemos responder ainda como se dá esta modulação. Uma possibilidade seria a interação que o sistema opióide tem com o sistema dopaminérgico na via mesolímbica. Como mencionado na

introdução, a presença de receptores dos subtipos μ -, δ - e κ -opióides e de peptídeos opióides no núcleo *accumbens* é bem documentada (Wamsley *et al.*, 1980; George *et al.*, 1994; Turchan *et al.*, 1999; Meshul e McGinty, 2000). A ativação dos receptores μ - (Spanagel *et al.*, 1990; Yoshida *et al.*, 1999; Piepponen *et al.*, 1999) e δ -opióides (Longoni *et al.*, 1991; Pentney e Gratton 1991; Svingos *et al.*, 1999) promove um aumento da concentração extracelular de dopamina, enquanto que a estimulação dos receptores κ -opióides resulta em redução na liberação de dopamina (Spanagel *et al.*, 1990; Marinelli *et al.*, 1998). A administração de etanol leva ao aumento de opióides endógenos no núcleo *accumbens* (Olive *et al.*, 2001) que, por sua vez, pode modular a liberação de dopamina. A naltrexona e antagonistas opióides atenuam o aumento da dopamina no núcleo *accumbens* após a injeção sistêmica ou local de etanol (Acquas *et al.*, 1993; Benjamin *et al.*, 1993; Gonzales e Weiss 1998), um mecanismo proposto para a supressão do consumo de etanol pela naltrexona (Gonzales e Weiss, 1998). Assim, é possível que o bloqueio da tolerância pelo antagonista seletivo do tipo μ - tenha relação como bloqueio indireto da liberação de dopamina. Já os efeitos do antagonismo dos receptores do tipo κ - na tolerância são mais difíceis de interpretar devido à localização predominantemente pré-sináptica e possível aumento da liberação dopamina decorrente do bloqueio deste subtipo.

A atividade do núcleo *accumbens* em processar o reforço promovido por drogas de abuso ou reforçadores naturais parece envolver um componente associativo importante (Di Chiara, 2002). A apresentação de um reforçador altera a taxa de disparo de neurônios da área tegmentar ventral, resultando no aumento da concentração extracelular de dopamina no núcleo *accumbens* (Yun *et al.*, 2004). Após algum treino, a apresentação de um estímulo condicionado ao reforçador (por exemplo: uma lâmpada que acende momentos antes da apresentação do reforço) é suficiente para aumentar a taxa de disparo destes neurônios (Schultz *et al.*, 1997). O aumento transitório de

dopamina no núcleo *accumbens* pode sinalizar a presença do reforçador no ambiente e levar o animal a um estado de alerta onde o processo de aprendizado e a evocação de comportamentos direcionados à procura do reforçador estariam facilitados (Gonzales *et al.*, 2004). Outros estudos demonstraram que a atividade dopaminérgica na porção *shell* do núcleo *accumbens* é aumentada durante a aquisição do comportamento pavloviano (Phillips *et al.*, 2003) e que uma estreita relação entre os sistemas dopaminérgico e NMDA pode existir no núcleo *accumbens* em processos de aprendizado (Di Ciano *et al.*, 2001; Gierler *et al.*, 2003).

Do ponto de vista evolutivo, a facilitação do aprendizado decorrente da apresentação de um reforçador natural (por ex: comida, parceiro sexual) permitiria ao animal uma melhor performance no momento em que o reforçador estivesse novamente presente. Em estudo recente, Roitman e colaboradores (2005) mostraram que neurônios do núcleo *accumbens* respondem de modo diferenciado a estímulos aversivos ou reforçadores não condicionados, desencadeando respostas motoras distintas, e que estes neurônios são capazes de responder a estímulos pareados com o estímulo não-condicionado. Além disso, o papel do núcleo *accumbens* no aprendizado de tarefas motoras não-declarativas e no condicionamento pavloviano é interessante, haja vista que nas últimas três décadas diversos estudos têm sugerido a participação do aprendizado no desenvolvimento de tolerância ao álcool, alterando deste modo seu conceito clássico (Chen *et al.*, 1968; LeBlanc *et al.*, 1975; Holloway *et al.*, 1989; Kalant, 1998; Larson e Siegel, 1998). Foi demonstrado que estímulos condicionados ao ambiente desempenham um papel importante na tolerância ao etanol (Melchior e Tabakoff, 1981; Tiffany *et al.*, 1987; Le *et al.*, 1987) e que a prática intoxicada também exerce papel facilitador na aquisição de tolerância à incoordenação motora provocada pelo etanol (Mansfield *et al.*, 1983; Vogel-Sprott *et al.*, 1984; Mayfield *et al.*, 1992; Khanna *et al.*, 1996). A tolerância pode ainda ser bloqueada por drogas que prejudicam o

aprendizado, por exemplo antagonistas do receptor NMDA para o glutamato (Wu *et al.*, 1993; Khanna *et al.*, 1998; Zaleski *et al.*, 2001; Wazlawik e Morato, 2003) e aumentada por drogas que facilitam o aprendizado (Khanna *et al.*, 1995).

A importância do receptor NMDA nos processos de plasticidade sináptica e aprendizado já é bem conhecida (para uma revisão recente ver Perez-Otano e Ehlers, 2004). Apesar do fato dos receptores NMDA serem inibidos após a administração aguda de etanol (Dar, 2002; Krystal *et al.*, 2003) e da importância deste receptor nos processos de aprendizado, a ação do álcool no receptor NMDA não bloqueia o desenvolvimento de tolerância, levando a um paradoxo interessante (Fadda e Rossetti, 1998). Uma possível solução para este paradoxo foi demonstrada por Maldve e colaboradores (2002). Em um estudo utilizando fatias do núcleo *accumbens* de ratos, estes autores observaram que a liberação de dopamina após a administração de etanol e a consequente ativação do receptor D₁, desencadeia uma cascata de fosforilação, via DARPP-32, que altera o receptor NMDA de uma conformação *sensível* ao etanol para outra *insensível* (Maldve *et al.*, 2002). Deste modo, a perda da sensibilidade do receptor NMDA ao etanol na célula alvo poderia permitir a atividade deste receptor no processo de plasticidade sináptica necessária ao desenvolvimento de tolerância (Lovinger, 2002). Como os antagonistas opióides reduzem indiretamente a liberação de dopamina (Herz, 1997; Bodnar 2003) a alteração de sensibilidade do receptor NMDA acima mencionada poderia ser reduzida indiretamente com a administração de naltrexona. Além disso, foi recentemente demonstrado o bloqueio da tolerância rápida ao etanol em camundongos pelo tratamento intraperitoneal com o antagonista D₁ SCH23390 (Batista *et al.*, 2005). Portanto, faz sentido supor que o bloqueio da tolerância pela injeção intra-*accumbens* de naltrexona ou naloxonazina seja consequência da interferência na

delicada relação entre opióides endógenos, dopamina e NMDA presente no núcleo *accumbens*. Todavia, estudos mais aprofundados serão necessários para consolidar esta hipótese.

Há que se considerar ainda outros sistemas de neurotransmissão. Como mencionado anteriormente, cerca de 90 % dos neurônios que compõem o núcleo *accumbens* são gabaérgicos. A sensibilidade destes neurônios se dá de forma diferenciada em ratos tolerantes e não-tolerantes ao etanol, sendo a inibição promovida pelo etanol menor nos animais tolerantes (Piepponen *et al.*, 2002) e sujeita a modificação após exposições repetidas (Nie *et al.*, 2000). Além disso, o efeito discriminativo do etanol é mediado em parte por receptores GABA_A, e a administração intra-*accumbens* de um agonista deste receptor substitui por completo a administração de etanol em um procedimento operante (Hodge e Cox, 1998; Besheer *et al.*, 2003). As possíveis interações entre os sistemas gabaérgico e opióide no desenvolvimento de tolerância ao álcool ainda carecem de estudos mais aprofundados.

Tomados em conjunto, nossos resultados permitem sugerir um maior envolvimento dos receptores μ -opióides no bloqueio da tolerância ao álcool. Os antagonistas usados neste estudo bloquearam a tolerância rápida quando injetados antes da prática intoxicada no Dia 1. Estudos anteriores demonstram que drogas eficazes no bloqueio da tolerância rápida quando injetadas apenas no Dia 1 ou nos Dias 1 e 2, foram ineficazes quando injetadas somente no Dia 2 (Khanna *et al.*, 1995; Barreto, 1997). Isto sugere que o aprendizado dependente de estado não seja fundamental no desenvolvimento da tolerância rápida. Portanto, apesar da hipótese do aprendizado dependente de estado não poder ser descartada com este protocolo, é provável que o bloqueio da tolerância seja consequência da interferência nos mecanismos que ocorrem durante a prática intoxicada no Dia 1. Além disso, as doses de naltrexona utilizadas estão de acordo com experimentos nos quais se observou uma redução no consumo de etanol e na concentração

extracelular de dopamina no núcleo *accumbens* (Gonzales e Weiss, 1998; Coonfield *et al.*, 2002) e, embora alguns estudos indiquem diferenças significativas entre as porções *core* e *shell* na modulação do comportamento de consumo do etanol (Zahm, 2000; Di Chiara, 2002), apenas o receptor κ -opióide mostrou diferença entre as porções *core* e *shell* na modulação da tolerância.

Apesar do bloqueio da tolerância ao álcool pela injeção de antagonistas opióides em doses que influenciam no comportamento de consumo de etanol, bem como a participação do núcleo *accumbens*, uma estrutura importante no abuso do álcool, ter sido demonstrada, estudos mais aprofundados são necessários para uma maior compreensão das relações entre o fenômeno da tolerância e o consumo elevado de etanol.

6. CONCLUSÕES

- A injeção sistêmica de naltrexona bloqueou o desenvolvimento da tolerância rápida à incoordenação motora provocada por etanol em ratos; efeito que foi revertido pela co-administração de morfina.
- A administração intra-*accumbens* de naltrexona bloqueou a tolerância rápida ao etanol de modo semelhante ao observado com a injeção sistêmica. Não foram detectadas diferenças entre as porções *core* e *shell* no efeito da naltrexona na tolerância ao álcool.
- O antagonista μ -opióide naloxonazina microinjetado nas porções *core* ou *shell* do núcleo *accumbens* bloqueou o desenvolvimento de tolerância rápida ao etanol.
- O antagonista δ -opióide naltrindol microinjetado nas porções *core* ou *shell* do núcleo *accumbens* não afetou o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol.
- O antagonista κ -opióide nor-binaltorfimina microinjetado na porção *shell* do núcleo *accumbens* não afetou o desenvolvimento de tolerância rápida ao etanol, entretanto, a microinjeção na porção *core* pode ter facilitado o comportamento de *tolerância por uma exposição* ou tolerância cruzada.
- Os resultados sugerem que o efeito da naltrexona microinjetada no núcleo *accumbens* sobre a tolerância rápida ao etanol deva-se predominantemente ao antagonismo dos receptores μ -opióides.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACQUAS E, MELONI M, and DI CHIARA G. Blockade of delta-opioid receptors in the nucleus accumbens prevents ethanol-induced stimulation of dopamine release. *Eur J Pharmacol*, 230: 239-41, 1993.
- ALDERMAN J, KATO S, and LIEBER CS. The microsomal ethanol oxidizing system mediates metabolic tolerance to ethanol in deermice lacking alcohol dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys*, 271: 33-9, 1989.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. and AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. TASK FORCE ON DSM-IV. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders : Dsm-iv-tr*. Washington, DC: American Psychiatric Association, 2000.
- ARVOLA A, SAMMALISTO L, and WALLGREN H. A test for level of alcohol intoxication in the rat. *Q J Stud Alcohol*, 19: 563-72, 1958.
- BAXTER MG and MURRAY EA. The amygdala and reward. *Nat Rev Neurosci*, 3: 563-73, 2002.
- BARRETO PS. Influência do receptor NMDA e da síntese do óxido nítrico sobre a tolerância rápida ao etanol em ratos submetidos ao teste do rota-rod. *Dissertação (mestrado em Farmacologia) – Curso de Pós Graduação em Farmacologia*, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis SC. 1997
- BATISTA LC, PREDIGER RDS, MORATO GS and TAKAHASHI RN. Blockade of adenosine and dopamine receptors inhibits the development of rapid tolerance to ethanol in mice. *Psychopharmacology* (in press) 2005
- BECKER HC and LOPEZ MF. Increased ethanol drinking after repeated chronic ethanol exposure and withdrawal experience in c57bl/6 mice. *Alcohol Clin Exp Res*, 28: 1829-38, 2004.
- BENJAMIN D, GRANT ER, and POHORECKY LA. Naltrexone reverses ethanol-induced dopamine release in the nucleus accumbens in awake, freely moving rats. *Brain Res*, 621: 137-40, 1993.
- BERENDSE HW, GROENEWEGEN HJ, and LOHMAN AH. Compartmental distribution of ventral striatal neurons projecting to the mesencephalon in the rat. *J Neurosci*, 12: 2079-103, 1992.
- BERTOGLIO LJ and CAROBREZ AP. Anxiolytic effects of ethanol and phenobarbital are abolished in test-experienced rats submitted to the elevated plus maze. *Pharmacol Biochem Behav*, 73: 963-9, 2002.
- BESHEER J, COX AA, and HODGE CW. Coregulation of ethanol discrimination by the nucleus accumbens and amygdala. *Alcohol Clin Exp Res*, 27: 450-6, 2003.
- BODNAR RJ and KLEIN GE. Endogenous opiates and behavior: 2003. *Peptides*, 25: 2205-56, 2004.
- BOEHM SL, 2ND, PEDEN L, CHANG R, HARRIS RA, and BLEDNOV YA. Deletion of the fyn-kinase gene alters behavioral sensitivity to ethanol. *Alcohol Clin Exp Res*, 27: 1033-40, 2003.
- BREESE GR, OVERSTREET DH, KNAPP DJ, and NAVARRO M. Prior multiple ethanol withdrawals enhance stress-induced anxiety-like behavior: Inhibition by crf(1)- and benzodiazepine-receptor antagonists and a 5-HT(1a)-receptor agonist. *Neuropsychopharmacology*, 2005.
- BRICK J and HOROWITZ GP. Tolerance and cross-tolerance to morphine and ethanol in mice selectively bred for differential sensitivity to ethanol. *J Stud Alcohol*, 44: 770-9, 1983.
- CARLEZON WA, JR. and NESTLER EJ. Elevated levels of glur1 in the midbrain: A trigger for sensitization to drugs of abuse? *Trends Neurosci*, 25: 610-5, 2002.

- CEBRID – Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas. In I Levantamento Domiciliar de Consumo de Entorpecentes. UNIFESP-EPM. 2002.
- CHARNESS ME, QUERIMIT LA, and HENTELEFF M. Ethanol differentially regulates g proteins in neural cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 155: 138-43, 1988.
- CHEN CS. A study of the alcohol-tolerance effect and an introduction of a new behavioural technique. *Psychopharmacologia*, 12: 433-40, 1968.
- CICCOCIOPPO R, MARTIN-FARDON R, and WEISS F. Effect of selective blockade of mu(1) or delta opioid receptors on reinstatement of alcohol-seeking behavior by drug-associated stimuli in rats. *Neuropsychopharmacology*, 27: 391-9, 2002.
- COONFIELD DL, HILL KG, KACZMAREK HJ, FERRARO FM, 3RD, and KIEFER SW. Low doses of naltrexone reduce palatability and consumption of ethanol in outbred rats. *Alcohol*, 26: 43-7, 2002.
- CORREA M, SANCHIS-SEGURA C, PASTOR R, and ARAGON CM. Ethanol intake and motor sensitization: The role of brain catalase activity in mice with different genotypes. *Physiol Behav*, 82: 231-40, 2004.
- COSGROVE KP and CARROLL ME. Effects of bremazocine on self-administration of smoked cocaine base and orally delivered ethanol, phencyclidine, saccharin, and food in rhesus monkeys: A behavioral economic analysis. *J Pharmacol Exp Ther*, 301: 993-1002, 2002.
- CRAGG B. Preservation of extracellular space during fixation of the brain for electron microscopy. *Tissue Cell*, 12: 63-72, 1980.
- DA SILVA GE, MORATO GS, and TAKAHASHI RN. Rapid tolerance to delta(9)-tetrahydrocannabinol and cross-tolerance between ethanol and delta(9)-tetrahydrocannabinol in mice. *Eur J Pharmacol*, 431: 201-7, 2001.
- DAR MS. Mouse cerebellar adenosine-glutamate interactions and modulation of ethanol-induced motor incoordination. *Alcohol Clin Exp Res*, 26: 1395-403, 2002.
- DAVIES M. The role of gabaa receptors in mediating the effects of alcohol in the central nervous system. *J Psychiatry Neurosci*, 28: 263-74, 2003.
- DAWSON DA. Heavy drinking and the risk of occupational injury. *Accid Anal Prev*, 26: 655-65, 1994.
- DI CHIARA G and IMPERATO A. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85: 5274-8, 1988.
- DI CHIARA G. The role of dopamine in drug abuse viewed from the perspective of its role in motivation. *Drug Alcohol Depend*, 38: 95-137, 1995.
- DI CHIARA G. Nucleus accumbens shell and core dopamine: Differential role in behavior and addiction. *Behav Brain Res*, 137: 75-114, 2002.
- DI CIANO P, CARDINAL RN, COWELL RA, LITTLE SJ, and EVERITT BJ. Differential involvement of nmda, ampa/kainate, and dopamine receptors in the nucleus accumbens core in the acquisition and performance of pavlovian approach behavior. *J Neurosci*, 21: 9471-7, 2001.
- DILDY JE and LESLIE SW. Ethanol inhibits nmda-induced increases in free intracellular ca²⁺ in dissociated brain cells. *Brain Res*, 499: 383-7, 1989.

- DUDEK BC and PHILLIPS TJ. Distinctions among sedative, disinhibitory, and ataxic properties of ethanol in inbred and selectively bred mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 101: 93-9, 1990.
- EHLERS CL, SOMES C, and CLOUTIER D. Are some of the effects of ethanol mediated through npy? *Psychopharmacology (Berl)*, 139: 136-44, 1998.
- EHRIG T, BOSRON WF, and LI TK. Alcohol and aldehyde dehydrogenase. *Alcohol Alcohol*, 25: 105-16, 1990.
- FADDA F and ROSSETTI ZL. Chronic ethanol consumption: From neuroadaptation to neurodegeneration. *Prog Neurobiol*, 56: 385-431, 1998.
- FILE SE, MABBUTT PS, and HITCHCOTT PK. Characterisation of the phenomenon of "one-trial tolerance" to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze. *Psychopharmacology (Berl)*, 102: 98-101, 1990.
- FLEURET-BALTER C, BEAUGE F, BARIN F, NORDMANN J, and NORDMANN R. Brain membrane disordering by administration of a single ethanol dose. *Pharmacol Biochem Behav*, 18 Suppl 1: 25-9, 1983.
- FRANKS NP and LIEB WR. Seeing the light: Protein theories of general anesthesia. 1984. *Anesthesiology*, 101: 235-7, 2004.
- FRENCH SJ and TOTTERDELL S. Individual nucleus accumbens-projection neurons receive both basolateral amygdala and ventral subicular afferents in rats. *Neuroscience*, 119: 19-31, 2003.
- FROEHLICH JC and LI TK. Opioid involvement in alcohol drinking. *Ann N Y Acad Sci*, 739: 156-67, 1994.
- FROEHLICH JC. The neurobiology of ethanol-opioid interactions in ethanol reinforcement. *Alcohol Clin Exp Res*, 20: 181A-186A, 1996.
- GALLATE JE, MORLEY KC, AMBERMOON P, and MCGREGOR IS. The consequences of beer consumption in rats: Acute anxiolytic and ataxic effects and withdrawal-induced anxiety. *Psychopharmacology (Berl)*, 166: 51-60, 2003.
- GARRIS PA, KILPATRICK M, BUNIN MA, MICHAEL D, WALKER QD, and WIGHTMAN RM. Dissociation of dopamine release in the nucleus accumbens from intracranial self-stimulation. *Nature*, 398: 67-9, 1999.
- GEORGE SR, ZASTAWNY RL, BRIONES-URBINA R, CHENG R, NGUYEN T, HEIBER M, KOUVELAS A, CHAN AS, and O'DOWD BF. Distinct distributions of mu, delta and kappa opioid receptor mRNA in rat brain. *Biochem Biophys Res Commun*, 205: 1438-44, 1994.
- GIANOULAKIS C. Endogenous opioids and excessive alcohol consumption. *J Psychiatry Neurosci*, 18: 148-56, 1993.
- GIERTLER C, BOHN I, and HAUBER W. The rat nucleus accumbens is involved in guiding of instrumental responses by stimuli predicting reward magnitude. *Eur J Neurosci*, 18: 1993-6, 2003.
- GILPIN NW, STEWART RB, MURPHY JM, and BADIA-ELDER NE. Neuropeptide y in the paraventricular nucleus of the hypothalamus increases ethanol intake in high- and low-alcohol-drinking rats. *Alcohol Clin Exp Res*, 28: 1492-8, 2004.
- GOEDDE HW, AGARWAL DP, HARADA S, MEIER-TACKMANN D, RUOFU D, BIENZLE U, KROEGER A, and HUSSEIN L. Population genetic studies on aldehyde dehydrogenase isozyme deficiency and alcohol sensitivity. *Am J Hum Genet*, 35: 769-72, 1983.

- GOEDDE HW, AGARWAL DP, ECKEY R, and HARADA S. Population genetic and family studies on aldehyde dehydrogenase deficiency and alcohol sensitivity. *Alcohol*, 2: 383-90, 1985.
- GONZALES RA and WEISS F. Suppression of ethanol-reinforced behavior by naltrexone is associated with attenuation of the ethanol-induced increase in dialysate dopamine levels in the nucleus accumbens. *J Neurosci*, 18: 10663-71, 1998.
- GONZALES RA, JOB MO, and DOYON WM. The role of mesolimbic dopamine in the development and maintenance of ethanol reinforcement. *Pharmacol Ther*, 103: 121-46, 2004.
- GORDON AS, COLLIER K, and DIAMOND I. Ethanol regulation of adenosine receptor-stimulated camp levels in a clonal neural cell line: An in vitro model of cellular tolerance to ethanol. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83: 2105-8, 1986.
- HAHN EF, CARROLL-BUATTI M, and PASTERNAK GW. Irreversible opiate agonists and antagonists: The 14-hydroxydihydromorphinone azines. *J Neurosci*, 2: 572-6, 1982.
- HALL FS, SORA I, and UHL GR. Ethanol consumption and reward are decreased in mu-opiate receptor knockout mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 154: 43-9, 2001.
- HANCHAR HJ, WALLNER M, and OLSEN RW. Alcohol effects on gamma-aminobutyric acid type a receptors: Are extrasynaptic receptors the answer? *Life Sci*, 76: 1-8, 2004.
- HEINZ A, RAGAN P, JONES DW, HOMMER D, WILLIAMS W, KNABLE MB, GOREY JG, DOTY L, GEYER C, LEE KS, COPPOLA R, WEINBERGER DR, and LINNOILA M. Reduced central serotonin transporters in alcoholism. *Am J Psychiatry*, 155: 1544-9, 1998.
- HENNIGER MS, SPANAGEL R, WIGGER A, LANDGRAF R, and HOLTER SM. Alcohol self-administration in two rat lines selectively bred for extremes in anxiety-related behavior. *Neuropsychopharmacology*, 26: 729-36, 2002.
- HERZ A. Endogenous opioid systems and alcohol addiction. *Psychopharmacology (Berl)*, 129: 99-111, 1997.
- HIMMELSBACH CK. The morphine abstinence syndrome, its nature and treatment. *Ann Int Med* 2, 829 – 843. 1941
- HJELMSTAD GO and FIELDS HL. Kappa opioid receptor inhibition of glutamatergic transmission in the nucleus accumbens shell. *J Neurophysiol*, 85: 1153-8, 2001.
- HODGE CW and COX AA. The discriminative stimulus effects of ethanol are mediated by nmda and gaba(a) receptors in specific limbic brain regions. *Psychopharmacology (Berl)*, 139: 95-107, 1998.
- HODGES H, ALLEN Y, SINDEN J, MITCHELL SN, ARENDT T, LANTOS PL, and GRAY JA. The effects of cholinergic drugs and cholinergic-rich foetal neural transplants on alcohol-induced deficits in radial maze performance in rats. *Behav Brain Res*, 43: 7-28, 1991.
- HOLLOWAY FA, KING DA, MICHAELIS RC, HARLAND RD, and BIRD DC. Tolerance to ethanol's disruptive effects on operant behavior in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 99: 479-85, 1989.
- HOLTER SM and SPANAGEL R. Effects of opiate antagonist treatment on the alcohol deprivation effect in long-term ethanol-experienced rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 145: 360-9, 1999.
- HOLTER SM, HENNIGER MS, LIPKOWSKI AW, and SPANAGEL R. Kappa-opioid receptors and relapse-like drinking in long-term ethanol-experienced rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 153: 93-102, 2000.

- HONKANEN A, VILAMO L, WEGELIUS K, SARVIHARJU M, HYYTIA P, and KORPI ER. Alcohol drinking is reduced by a μ 1- but not by a delta-opioid receptor antagonist in alcohol-preferring rats. *Eur J Pharmacol*, 304: 7-13, 1996.
- HUNGUND BL and BASAVARAJAPPA BS. Are anandamide and cannabinoid receptors involved in ethanol tolerance? A review of the evidence. *Alcohol Alcohol*, 35: 126-33, 2000.
- HUNT WA and MAJCHROWICZ E. Studies of neurotransmitter interactions after acute and chronic ethanol administration. *Pharmacol Biochem Behav*, 18 Suppl 1: 371-4, 1983.
- HUNT WA and MULLIN MJ. Effects of ethanol exposure on brain sodium channels. *Alcohol Drug Res*, 6: 419-22, 1985.
- HWANG BH, ZHANG JK, EHLERS CL, LUMENG L, and LI TK. Innate differences of neuropeptide y (npy) in hypothalamic nuclei and central nucleus of the amygdala between selectively bred rats with high and low alcohol preference. *Alcohol Clin Exp Res*, 23: 1023-30, 1999.
- HYYTIA P and KIIANMAA K. Suppression of ethanol responding by centrally administered ctop and naltrindole in aa and wistar rats. *Alcohol Clin Exp Res*, 25: 25-33, 2001.
- IMPRAIM C, WANG G, and YOSHIDA A. Structural mutation in a major human aldehyde dehydrogenase gene results in loss of enzyme activity. *Am J Hum Genet*, 34: 837-41, 1982.
- INOUE K, FUKUNAGA M, KIRIYAMA T, and KOMURA S. Accumulation of acetaldehyde in alcohol-sensitive japanese: Relation to ethanol and acetaldehyde oxidizing capacity. *Alcohol Clin Exp Res*, 8: 319-22, 1984.
- ITO R, DALLEY JW, HOWES SR, ROBBINS TW, and EVERITT BJ. Dissociation in conditioned dopamine release in the nucleus accumbens core and shell in response to cocaine cues and during cocaine-seeking behavior in rats. *J Neurosci*, 20: 7489-95, 2000.
- ITO R, ROBBINS TW, and EVERITT BJ. Differential control over cocaine-seeking behavior by nucleus accumbens core and shell. *Nat Neurosci*, 7: 389-97, 2004.
- JONES AW. The drunkest drinking driver in sweden: Blood alcohol concentration 0.545% w/v. *J Stud Alcohol*, 60: 400-6, 1999.
- JORGENSEN HA, FASMER OB, and HOLE K. Learned and pharmacologically-induced tolerance to ethanol and cross-tolerance to morphine and clonidine. *Pharmacol Biochem Behav*, 24: 1083-8, 1986.
- JUNE HL, MCCANE SR, ZINK RW, PORTOGHESE PS, LI TK, and FROEHLICH JC. The delta 2-opioid receptor antagonist naltriben reduces motivated responding for ethanol. *Psychopharmacology (Berl)*, 147: 81-9, 1999.
- KALANT H. Current state of knowledge about the mechanisms of alcohol tolerance. *Addict Biol*, 1: 133-41, 1996.
- KALANT H. Research on tolerance: What can we learn from history? *Alcohol Clin Exp Res*, 22: 67-76, 1998.
- KELAI S, AISSI F, LESCH KP, COHEN-SALMON C, HAMON M, and LANFUMEY L. Alcohol intake after serotonin transporter inactivation in mice. *Alcohol Alcohol*, 38: 386-9, 2003.
- KELLEY AE and DOMESICK VB. The distribution of the projection from the hippocampal formation to the nucleus accumbens in the rat: An anterograde- and retrograde-horseradish peroxidase study. *Neuroscience*, 7: 2321-35, 1982.

- KHANNA JM, LE AD, KALANT H, and LEBLANC AE. Cross-tolerance between ethanol and morphine with respect to their hypothermic effects. *Eur J Pharmacol*, 59: 145-9, 1979.
- KHANNA JM, KALANT H, SHAH G, and WEINER J. Rapid tolerance as an index of chronic tolerance. *Pharmacol Biochem Behav*, 38: 427-32, 1991.
- KHANNA JM, KALANT H, WEINER J, and SHAH G. Rapid tolerance and cross-tolerance as predictors of chronic tolerance and cross-tolerance. *Pharmacol Biochem Behav*, 41: 355-60, 1992.
- KHANNA JM, MORATO GS, CHAU A, SHAH G, and KALANT H. Effect of nmda antagonists on rapid and chronic tolerance to ethanol: Importance of intoxicated practice. *Pharmacol Biochem Behav*, 48: 755-63, 1994.
- KHANNA JM, MORATO GS, CHAU A, and SHAH G. D-cycloserine enhances rapid tolerance to ethanol motor incoordination. *Pharmacol Biochem Behav*, 52: 609-14, 1995.
- KHANNA JM, CHAU A, and SHAH G. Characterization of the phenomenon of rapid tolerance to ethanol. *Alcohol*, 13: 621-8, 1996.
- KHANNA JM, SHAH G, and CHAU A. Effect of nmda antagonists on rapid tolerance to ethanol under two different testing paradigms. *Pharmacol Biochem Behav*, 57: 693-7, 1997.
- KHANNA JM, KALANT H, CHAU A, and SHAH G. Rapid tolerance and crosstolerance to motor impairment effects of benzodiazepines, barbiturates, and ethanol. *Pharmacol Biochem Behav*, 59: 511-9, 1998.
- KHANNA JM, MORATO GS, and KALANT H. Effect of nmda antagonists, an nmda agonist, and serotonin depletion on acute tolerance to ethanol. *Pharmacol Biochem Behav*, 72: 291-8, 2002.
- KIM SG, STROMBERG MF, KIM MJ, VOLPICELLI JR, and PARK JM. The effect of antagonists selective for mu- and delta-opioid receptor subtypes on alcohol consumption in c57bl/6 mice. *Alcohol*, 22: 85-90, 2000.
- KNAPP DJ, OVERSTREET DH, and BREESE GR. Modulation of ethanol withdrawal-induced anxiety-like behavior during later withdrawals by treatment of early withdrawals with benzodiazepine/gamma-aminobutyric acid ligands. *Alcohol Clin Exp Res*, 29: 553-63, 2005.
- KOOB GF and LE MOAL M. Drug abuse: Hedonic homeostatic dysregulation. *Science*, 278: 52-8, 1997.
- KOOB GF. Alcoholism: Allostasis and beyond. *Alcohol Clin Exp Res*, 27: 232-43, 2003.
- KOOB GF, AHMED SH, BOUTREL B, CHEN SA, KENNY PJ, MARKOU A, O'DELL LE, PARSONS LH, and SANNA PP. Neurobiological mechanisms in the transition from drug use to drug dependence. *Neurosci Biobehav Rev*, 27: 739-49, 2004.
- KRANZLER HR. Pharmacotherapy of alcoholism: Gaps in knowledge and opportunities for research. *Alcohol Alcohol*, 35: 537-47, 2000.
- KRYSTAL JH, PETRAKIS IL, MASON G, TREVISAN L, and D'SOUZA DC. N-methyl-d-aspartate glutamate receptors and alcoholism: Reward, dependence, treatment, and vulnerability. *Pharmacol Ther*, 99: 79-94, 2003.
- KUMARI M and TICKU MK. Regulation of nmda receptors by ethanol. *Prog Drug Res*, 54: 152-89, 2000.
- LANDS WE. Alcohol's impact upon glycobiology. *Indian J Biochem Biophys*, 34: 212-3, 1997.

- LARSON SJ and SIEGEL S. Learning and tolerance to the ataxic effect of ethanol. *Pharmacol Biochem Behav*, 61: 131-42, 1998.
- LAWYER SR, KARG RS, MURPHY JG, and MCGLYNN FD. Heavy drinking among college students is influenced by anxiety sensitivity, gender, and contexts for alcohol use. *J Anxiety Disord*, 16: 165-73, 2002.
- LE AD, KHANNA JM, KALANT H, and LEBLANC AE. Cross-tolerance between ethanol and morphine. *Adv Exp Med Biol*, 132: 771-7, 1980.
- LE AD, KALANT H, and KHANNA JM. Effects of treatment dose and intoxicated practice on the development of tolerance to ethanol-induced motor impairment. *Alcohol Alcohol*, Suppl 1: 435-9, 1987.
- LEBLANC AE, GIBBINS RJ, and KALANT H. Generalization of behaviorally augmented tolerance to ethanol, and its relation to physical dependence. *Psychopharmacologia*, 44: 241-6, 1975.
- LI XW, LI TK, and FROEHLICH JC. Enhanced sensitivity of the nucleus accumbens proenkephalin system to alcohol in rats selectively bred for alcohol preference. *Brain Res*, 794: 35-47, 1998.
- LIEBER CS. Microsomal ethanol oxidizing system (meos): Interaction with ethanol, drugs and carcinogens. *Pharmacol Biochem Behav*, 18 Suppl 1: 181-7, 1983.
- LIEBER CS. The microsomal ethanol oxidizing system: Its role in ethanol and xenobiotic metabolism. *Biochem Soc Trans*, 16: 232-9, 1988.
- LIEBER CS. Hepatic, metabolic and toxic effects of ethanol: 1991 update. *Alcohol Clin Exp Res*, 15: 573-92, 1991.
- LIEBER CS. Microsomal ethanol-oxidizing system (meos): The first 30 years (1968-1998)--a review. *Alcohol Clin Exp Res*, 23: 991-1007, 1999.
- LIEBER CS. The discovery of the microsomal ethanol oxidizing system and its physiologic and pathologic role. *Drug Metab Rev*, 36: 511-29, 2004.
- LINDHOLM S, WERME M, BRENE S, and FRANCK J. The selective kappa-opioid receptor agonist u50,488h attenuates voluntary ethanol intake in the rat. *Behav Brain Res*, 120: 137-46, 2001.
- LINSEMAN MA and LE AD. Effects of opioids on the absorption of alcohol. *Pharmacol Biochem Behav*, 58: 79-84, 1997.
- LONGONI R, SPINA L, MULAS A, CARBONI E, GARAU L, MELCHIORRI P, and DI CHIARA G. (d-alal2)deltorphin ii: D1-dependent stereotypies and stimulation of dopamine release in the nucleus accumbens. *J Neurosci*, 11: 1565-76, 1991.
- LOVINGER DM, WHITE G, and WEIGHT FF. Ethanol inhibits nmda-activated ion current in hippocampal neurons. *Science*, 243: 1721-4, 1989.
- LOVINGER DM. Nmda receptors lose their inhibitions. *Nat Neurosci*, 5: 614-6, 2002.
- MAILLIARD WS and DIAMOND I. Recent advances in the neurobiology of alcoholism: The role of adenosine. *Pharmacol Ther*, 101: 39-46, 2004.
- MALDVE RE, ZHANG TA, FERRANI-KILE K, SCHREIBER SS, LIPPMANN MJ, SNYDER GL, FIENBERG AA, LESLIE SW, GONZALES RA, and MORRISETT RA. Darpp-32 and regulation of the ethanol sensitivity of nmda receptors in the nucleus accumbens. *Nat Neurosci*, 5: 641-8, 2002.

- MANSFIELD JG, BENEDICT RS, and WOODS SC. Response specificity of behaviorally augmented tolerance to ethanol supports a learning interpretation. *Psychopharmacology (Berl)*, 79: 94-8, 1983.
- MANSOUR A, FOX CA, AKIL H, and WATSON SJ. Opioid-receptor mrna expression in the rat cns: Anatomical and functional implications. *Trends Neurosci*, 18: 22-9, 1995.
- MARINELLI M, BARROT M, SIMON H, OBERLANDER C, DEKEYNE A, LE MOAL M, and PIAZZA PV. Pharmacological stimuli decreasing nucleus accumbens dopamine can act as positive reinforcers but have a low addictive potential. *Eur J Neurosci*, 10: 3269-75, 1998.
- MATSUMOTO H and FUKUI Y. Pharmacokinetics of ethanol: A review of the methodology. *Addict Biol*, 7: 5-14, 2002.
- MAYFIELD RD, GRANT M, SCHALLERT T, and SPIRDUSO WW. Tolerance to the effects of ethanol on the speed and success of reaction time responding in the rat: Effects of age and intoxicated practice. *Psychopharmacology (Berl)*, 107: 78-82, 1992.
- MCFADZEAN I, LACEY MG, HILL RG, and HENDERSON G. Kappa opioid receptor activation depresses excitatory synaptic input to rat locus coeruleus neurons in vitro. *Neuroscience*, 20: 231-9, 1987.
- MELCHIOR CL and TABAKOFF B. Modification of environmentally cued tolerance to ethanol in mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 219: 175-80, 1981.
- MEREDITH GE. The synaptic framework for chemical signaling in nucleus accumbens. *Ann N Y Acad Sci*, 877: 140-56, 1999.
- MESHUL CK and MCGINTY JF. Kappa opioid receptor immunoreactivity in the nucleus accumbens and caudate-putamen is primarily associated with synaptic vesicles in axons. *Neuroscience*, 96: 91-9, 2000.
- MHATRE M and HOLLOWAY F. Micro1-opioid antagonist naloxonazine alters ethanol discrimination and consumption. *Alcohol*, 29: 109-16, 2003.
- MICELI D, MARFAING-JALLAT P, and LE MAGNEN J. Failure of naloxone to affect initial and acquired tolerance to ethanol in rats. *Eur J Pharmacol*, 63: 327-33, 1980.
- MOCHLY-ROSEN D, CHANG FH, CHEEVER L, KIM M, DIAMOND I, and GORDON AS. Chronic ethanol causes heterologous desensitization of receptors by reducing alpha s messenger rna. *Nature*, 333: 848-50, 1988.
- MORGAN CJ, BADAWY AA, THOMAS DR, DANDO TG, and KIRBY A. The [lactate]/[pyruvate] ratio and alcohol metabolism: Experiments with naloxone in fasting normal male volunteers. *Alcohol Alcohol*, 24: 185-8, 1989.
- NESTBY P, SCHOFFELMEER AN, HOMBERG JR, WARDEH G, DE VRIES TJ, MULDER AH, and VANDERSCHUREN LJ. Bremazocine reduces unrestricted free-choice ethanol self-administration in rats without affecting sucrose preference. *Psychopharmacology (Berl)*, 142: 309-17, 1999.
- NESTLER EJ and AGHAJANIAN GK. Molecular and cellular basis of addiction. *Science*, 278: 58-63, 1997.
- NESTLER EJ. Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nat Rev Neurosci*, 2: 119-28, 2001.
- NEZNANOVA ON, BLOKHINA EA, SUKHOTINA IA, and BESPALOV AY. Motor impairment produced by ethanol and site-selective nmda receptor antagonists in mice: Tolerance and cross-tolerance. *Alcohol*, 20: 31-6, 2000.

- NIE Y, STUBBS CD, WILLIAMS BW, and RUBIN E. Ethanol causes decreased partitioning into biological membranes without changes in lipid order. *Arch Biochem Biophys*, 268: 349-59, 1989.
- NIE Z, MADAMBA SG, and SIGGINS GR. Ethanol enhances gamma-aminobutyric acid responses in a subpopulation of nucleus accumbens neurons: Role of metabotropic glutamate receptors. *J Pharmacol Exp Ther*, 293: 654-61, 2000.
- O'MALLEY SS, JAFFE AJ, CHANG G, SCHOTTENFELD RS, MEYER RE, and ROUNSAVILLE B. Naltrexone and coping skills therapy for alcohol dependence. A controlled study. *Arch Gen Psychiatry*, 49: 881-7, 1992.
- OLIVE MF, KOENIG HN, NANNINI MA, and HODGE CW. Stimulation of endorphin neurotransmission in the nucleus accumbens by ethanol, cocaine, and amphetamine. *J Neurosci*, 21: RC184, 2001.
- OSWALD LM and WAND GS. Opioids and alcoholism. *Physiol Behav*, 81: 339-58, 2004.
- PAREDES A. Social control of drinking among the aztec indians of mesoamerica. *J Stud Alcohol*, 36: 1139-53, 1975.
- PASTOR R, SANCHIS-SEGURA C, and ARAGON CM. Brain catalase activity inhibition as well as opioid receptor antagonism increases ethanol-induced hpa axis activation. *Alcohol Clin Exp Res*, 28: 1898-906, 2004.
- PAXINOS G and WATSON C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Sydney ; Orlando: Academic Press, 1997.
- PENTNEY RJ and GRATTON A. Effects of local delta and mu opioid receptor activation on basal and stimulated dopamine release in striatum and nucleus accumbens of rat: An in vivo electrochemical study. *Neuroscience*, 45: 95-102, 1991.
- PEREZ-OTANO I and EHLERS MD. Learning from nmda receptor trafficking: Clues to the development and maturation of glutamatergic synapses. *Neurosignals*, 13: 175-89, 2004.
- PHILLIPS GD, SETZU E, VUGLER A, and HITCHCOTT PK. Immunohistochemical assessment of mesotelencephalic dopamine activity during the acquisition and expression of pavlovian versus instrumental behaviours. *Neuroscience*, 117: 755-67, 2003.
- PIEPPONEN TP, HONKANEN A, KIVASTIK T, ZHARKOVSKY A, TURTIA A, MIKKOLA JA, and AHTEE L. Involvement of opioid mu1-receptors in opioid-induced acceleration of striatal and limbic dopaminergic transmission. *Pharmacol Biochem Behav*, 63: 245-52, 1999.
- PIEPPONEN TP, KIIANMAA K, and AHTEE L. Effects of ethanol on the accumbal output of dopamine, gaba and glutamate in alcohol-tolerant and alcohol-nontolerant rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 74: 21-30, 2002.
- PORRINO LJ, WHITLOW CT, and SAMSON HH. Effects of the self-administration of ethanol and ethanol/sucrose on rates of local cerebral glucose utilization in rats. *Brain Res*, 791: 18-26, 1998.
- PORTOGHESE PS, LIPKOWSKI AW, and TAKEMORI AE. Binaltorphimine and nor-binaltorphimine, potent and selective kappa-opioid receptor antagonists. *Life Sci*, 40: 1287-92, 1987.
- PORTOGHESE PS, SULTANA M, and TAKEMORI AE. Naltrindole, a highly selective and potent non-peptide delta opioid receptor antagonist. *Eur J Pharmacol*, 146: 185-6, 1988.
- QUERTEMONT E, GREEN HL, and GRANT KA. Brain ethanol concentrations and ethanol discrimination in rats: Effects of dose and time. *Psychopharmacology (Berl)*, 168: 262-70, 2003.

- QUINTANILLA ME and TAMPIER L. Effect of naltrexone on acute tolerance to ethanol in uchb rats. *Alcohol*, 21: 245-9, 2000.
- RADLOW R. A quantitative theory of acute tolerance to alcohol. *Psychopharmacology (Berl)*, 114: 1-8, 1994.
- ROBERTS AJ, MCDONALD JS, HEYSER CJ, KIEFFER BL, MATTHES HW, KOOB GF, and GOLD LH. Mu-opioid receptor knockout mice do not self-administer alcohol. *J Pharmacol Exp Ther*, 293: 1002-8, 2000.
- ROITMAN MF, WHEELER RA, and CARELLI RM. Nucleus accumbens neurons are innately tuned for rewarding and aversive taste stimuli, encode their predictors, and are linked to motor output. *Neuron*, 45: 587-97, 2005.
- RON D. Signaling cascades regulating nmda receptor sensitivity to ethanol. *Neuroscientist*, 10: 325-36, 2004.
- RYABININ AE. Role of hippocampus in alcohol-induced memory impairment: Implications from behavioral and immediate early gene studies. *Psychopharmacology (Berl)*, 139: 34-43, 1998.
- SCHUCKIT MA. Low level of response to alcohol as a predictor of future alcoholism. *Am J Psychiatry*, 151: 184-9, 1994.
- SCHULTZ W, DAYAN P, and MONTAGUE PR. A neural substrate of prediction and reward. *Science*, 275: 1593-9, 1997.
- SEEMAN P, KWANT WO, GOLDBERG M, and CHAU-WONG M. The effects of ethanol and chlorpromazine on the passive membrane permeability to na⁺. *Biochim Biophys Acta*, 241: 349-55, 1971.
- SELLERS EM and HOLLOWAY MR. Drug kinetics and alcohol ingestion. *Clin Pharmacokinet*, 3: 440-52, 1978.
- SHARPE AL and SAMSON HH. Effect of naloxone on appetitive and consummatory phases of ethanol self-administration. *Alcohol Clin Exp Res*, 25: 1006-11, 2001.
- SHINONAGA Y, TAKADA M, and MIZUNO N. Topographic organization of collateral projections from the basolateral amygdaloid nucleus to both the prefrontal cortex and nucleus accumbens in the rat. *Neuroscience*, 58: 389-97, 1994.
- SIEGEL S and LARSON SJ. Disruption of tolerance to the ataxic effect of ethanol by an extraneous stimulus. *Pharmacol Biochem Behav*, 55: 125-30, 1996.
- SILVERI MM and SPEAR LP. The effects of nmda and gabaa pharmacological manipulations on acute and rapid tolerance to ethanol during ontogeny. *Alcohol Clin Exp Res*, 28: 884-94, 2004.
- SIMSON PE, CRISWELL HE, JOHNSON KB, HICKS RE, and BREESE GR. Ethanol inhibits nmda-evoked electrophysiological activity in vivo. *J Pharmacol Exp Ther*, 257: 225-31, 1991.
- SOLOMON RL and CORBIT JD. An opponent-process theory of motivation. I. Temporal dynamics of affect. *Psychol Rev*, 81: 119-45, 1974.
- SONG M and MESSING RO. Protein kinase c regulation of gabaa receptors. *Cell Mol Life Sci*, 62: 119-27, 2005.
- SPANAGEL R, HERZ A, and SHIPPENBERG TS. Identification of the opioid receptor types mediating beta-endorphin-induced alterations in dopamine release in the nucleus accumbens. *Eur J Pharmacol*, 190: 177-84, 1990.

- STROMBERG MF, CASALE M, VOLPICELLI L, VOLPICELLI JR, and O'BRIEN CP. A comparison of the effects of the opioid antagonists naltrexone, naltrindole, and beta-funaltrexamine on ethanol consumption in the rat. *Alcohol*, 15: 281-9, 1998.
- STROMBERG MF, MACKLER SA, VOLPICELLI JR, and O'BRIEN CP. Effect of acamprosate and naltrexone, alone or in combination, on ethanol consumption. *Alcohol*, 23: 109-16, 2001.
- SULLIVAN RJ and HAGEN EH. Psychotropic substance-seeking: Evolutionary pathology or adaptation? *Addiction*, 97: 389-400, 2002.
- SVINGOS AL, CLARKE CL, and PICKEL VM. Localization of the delta-opioid receptor and dopamine transporter in the nucleus accumbens shell: Implications for opiate and psychostimulant cross-sensitization. *Synapse*, 34: 1-10, 1999.
- TABAKOFF B and KILIANMAA K. Does tolerance develop to the activating, as well as the depressant, effects of ethanol? *Pharmacol Biochem Behav*, 17: 1073-6, 1982.
- TABAKOFF B and HOFFMAN PL. Alcohol interactions with brain opiate receptors. *Life Sci*, 32: 197-204, 1983.
- TABAKOFF B, CORNELL N, and HOFFMAN PL. Alcohol tolerance. *Ann Emerg Med*, 15: 1005-12, 1986.
- TANAKA E. Toxicological interactions between alcohol and benzodiazepines. *J Toxicol Clin Toxicol*, 40: 69-75, 2002.
- TANDA G, PONTIERI FE, and DI CHIARA G. Cannabinoid and heroin activation of mesolimbic dopamine transmission by a common mu1 opioid receptor mechanism. *Science*, 276: 2048-50, 1997.
- TAS PW, KRESS HG, and KOSCHEL K. General anesthetics can competitively interfere with sensitive membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84: 5972-5, 1987.
- TIFFANY ST, MCCAL KJ, and MAUDE-GRIFFIN PM. The contribution of classical conditioning to tolerance to the antinociceptive effects of ethanol. *Psychopharmacology (Berl)*, 92: 524-8, 1987.
- TIPTON KF, HARRINGTON MC, and KENNEDY NP. Biochemical markers for the effects of ethanol. *Alcohol Alcohol Suppl*, 2: 87-90, 1993.
- TSUTSUMI R, LEO MA, KIM CI, TSUTSUMI M, LASKER J, LOWE N, and LIEBER CS. Interaction of ethanol with enflurane metabolism and toxicity: Role of p450iie1. *Alcohol Clin Exp Res*, 14: 174-9, 1990.
- TURCHAN J, PRZEWLOCKA B, TOTH G, LASON W, BORSODI A, and PRZEWLOCKI R. The effect of repeated administration of morphine, cocaine and ethanol on mu and delta opioid receptor density in the nucleus accumbens and striatum of the rat. *Neuroscience*, 91: 971-7, 1999.
- USUDA I, TANAKA K, and CHIBA T. Efferent projections of the nucleus accumbens in the rat with special reference to subdivision of the nucleus: Biotinylated dextran amine study. *Brain Res*, 797: 73-93, 1998.
- VALENZUELA CF. Alcohol and neurotransmitter interactions. *Alcohol Health Res World*, 21: 144-8, 1997.
- VICINI S and ORTINSKI P. Genetic manipulations of gabaa receptor in mice make inhibition exciting. *Pharmacol Ther*, 103: 109-20, 2004.
- VIZI ES, FOLDES FF, RICH J, and KNOLL J. The structure-action relationship and kinetics of some naloxone and naltrexone derivatives. *Pharmacology*, 14: 76-85, 1976.

- VOGEL-SPROTT M, RAWANA E, and WEBSTER R. Mental rehearsal of a task under ethanol facilitates tolerance. *Pharmacol Biochem Behav*, 21: 329-31, 1984.
- VOLPICELLI JR, ALTERMAN AI, HAYASHIDA M, and O'BRIEN CP. Naltrexone in the treatment of alcohol dependence. *Arch Gen Psychiatry*, 49: 876-80, 1992.
- VOLPICELLI JR, RHINES KC, RHINES JS, VOLPICELLI LA, ALTERMAN AI, and O'BRIEN CP. Naltrexone and alcohol dependence. Role of subject compliance. *Arch Gen Psychiatry*, 54: 737-42, 1997.
- WAMSLEY JK, YOUNG WS, 3RD, and KUCHAR MJ. Anatomical localization of enkephalin immunoreactive sites in rat forebrain. *Adv Biochem Psychopharmacol*, 22: 257-70, 1980.
- WAZLAWIK E and MORATO GS. Effects of intracerebroventricular administration of 7-nitroindazole on tolerance to ethanol. *Brain Res Bull*, 57: 165-70, 2002.
- WAZLAWIK E and MORATO GS. Influence of drugs acting on nitric oxide-dependent pathways on ethanol tolerance in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 170: 343-50, 2003.
- WAZLAWIK E. Participação do receptor NMDA e do óxido nítrico na tolerância à incoordenação motora e à hipotermia induzidas por etanol. *Tese (doutorado em Farmacologia) – Curso de Pós-Graduação em Farmacologia*, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis SC. 2003.
- WING DR, HARVEY DJ, HUGHES J, DUNBAR PG, MCPHERSON KA, and PATON WD. Effects of chronic ethanol administration on the composition of membrane lipids in the mouse. *Biochem Pharmacol*, 31: 3431-9, 1982.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Status Report on Alcohol. *WHO Library Cataloguing-in-Publication Data*, Geneva. 2004.
- WU PH, MIHIC SJ, LIU JF, LE AD, and KALANT H. Blockade of chronic tolerance to ethanol by the nmda antagonist, (+)-mk-801. *Eur J Pharmacol*, 231: 157-64, 1993.
- YOSHIDA Y, KOIDE S, HIROSE N, TAKADA K, TOMIYAMA K, KOSHIKAWA N, and COOLS AR. Fentanyl increases dopamine release in rat nucleus accumbens: Involvement of mesolimbic mu- and delta-2-opioid receptors. *Neuroscience*, 92: 1357-65, 1999.
- YUN IA, WAKABAYASHI KT, FIELDS HL, and NICOLA SM. The ventral tegmental area is required for the behavioral and nucleus accumbens neuronal firing responses to incentive cues. *J Neurosci*, 24: 2923-33, 2004.
- ZAHM DS. An integrative neuroanatomical perspective on some subcortical substrates of adaptive responding with emphasis on the nucleus accumbens. *Neurosci Biobehav Rev*, 24: 85-105, 2000.
- ZALESKI MJ, NUNES FILHO JR, LEMOS T, and MORATO GS. Gaba(b) receptors play a role in the development of tolerance to ethanol in mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 153: 415-24, 2001.

ANEXO

Tabela 1: Valores de F e p para a naltrexona (NTX) via sistêmica (IP) ou intra-*accumbens*. GL: graus de liberdade.

NTX IP (mg/kg)	Dia 1						Dia 2				GL		
	Pre-tratamento		Tratamento		Interação pre-tratamento vs tratamento		Pre-tratamento		Tratamento			Interação pre-tratamento vs tratamento	
	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p		F	p
0,1	1,587	0,216	319,966	< 0,001	1,587	0,216	14,605	< 0,001	0,199	0,658	1,36		
0,3	1,440	0,238	1812,980	< 0,001	1,440	0,238	1,715	0,199	9,336	0,004	1,36		
0,6	0,455	0,504	302,700	< 0,001	0,455	0,504	0,100	0,753	4,116	0,049	1,36		
1,0	0,090	0,761	1200,440	< 0,001	0,090	0,761	19,817	< 0,001	0,932	0,341	1,36		
3,0	0,019	0,893	809,463	< 0,001	0,002	0,964	4,653	0,041	1,748	0,198	1,28		
NTX Shell (µg)	Dia 1						Dia 2				GL		
	Pre-tratamento		Tratamento		Interação pre-tratamento vs tratamento		Pre-tratamento		Tratamento			Interação pre-tratamento vs tratamento	
	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p		F	p
5	0,084	0,774	303,590	< 0,001	0,084	0,774	15,122	< 0,001	3,088	0,087	1,36		
10	0,423	0,520	359,973	< 0,001	1,496	0,230	6,702	0,014	4,556	0,040	1,32		
20	0,874	0,356	98,136	< 0,001	1,720	0,198	10,138	0,003	5,757	0,022	1,34		
NTX Core (µg)	Dia 1						Dia 2				GL		
	Pre-tratamento		Tratamento		Interação pre-tratamento vs tratamento		Pre-tratamento		Tratamento			Interação pre-tratamento vs tratamento	
	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p		F	p
5	0,005	0,943	1190,537	< 0,001	0,005	0,943	7,498	0,009	1,489	0,230	1,36		
10	1,090	0,303	1766,600	< 0,001	1,090	0,303	6,982	0,012	2,240	0,143	1,36		
20	0,080	0,779	582,004	< 0,001	0,080	0,779	9,287	0,004	7,219	0,011	1,33		

Tabela 2: Valores de F e p para a co-administração sistêmica de naltrexona (NTX) e morfina (MOR). GL: graus de liberdade.

NTX (0,3 mg/kg ip) vs MOR (0,3 mg/kg ip)	Dia 1		Dia 2		GL
	F	p	F	p	
Pré-tratamento 1 (naltrexona)	3,150	0,080	4,993	0,028	1,72
Pré-tratamento 2 (morfina)	1,853	0,177	5,903	0,017	1,72
Tratamento (etanol)	791,851	0,001	24,679	0,001	1,72
Pré-tratamento 1 vs Pré-tratamento 2	0,601	0,440	4,896	0,030	1,72
Pré tratamento 1 vs Tratamento	4,492	0,037	4,247	0,042	1,72
Pré tratamento 2 vs Tratamento	2,910	0,092	5,288	0,024	1,72
Pré-tratamento 1 vs pré-tratamento 2 vs tratamento	0,186	0,667	2,176	0,144	1,72

Tabela 3: Valores de F e p para os antagonistas seletivos naloxonazina (NLZ), naltrindol (NTD) e nor-binaltorfimina (BNI). GL: graus de liberdade.

NLZ Core (µg)	Dia 1				Dia 2				GL		
	Pre-tratamento		Tratamento		Interação pre-tratamento vs tratamento		Tratamento			Interação pre-tratamento vs tratamento	
	F	p	F	p	F	p	F	p		F	p
2	0,088	0,768	719,579	<0,001	0,173	0,679	5,134	0,029	3,469	0,071	1,36
4	1,410	0,242	276,367	<0,001	1,410	0,242	11,434	0,002	4,658	0,038	1,36
NLZ Shell (µg)	Dia 1				Dia 2				GL		
Pre-tratamento	Tratamento		Interação pre-tratamento vs tratamento		Tratamento		Interação pre-tratamento vs tratamento				
	F	p	F	P	F	p	F	p		F	p
2	0,068	0,795	528,400	<0,001	0,068	0,795	10,931	0,002	3,232	0,081	1,36
4	0,804	0,376	497,639	<0,001	0,804	0,376	5,029	0,031	4,854	0,034	1,36
NTD Core (µg)	Dia 1				Dia 2				GL		
Pre-tratamento	Tratamento		Interação pre-tratamento vs tratamento		Tratamento		Interação pre-tratamento vs tratamento				
	F	p	F	P	F	p	F	p		F	p
2	0,410	0,525	3969,920	<0,001	0,410	0,525	13,284	<0,001	0,001	0,982	1,35
4	0,114	0,738	478,114	<0,001	0,114	0,738	10,471	0,003	0,569	0,456	1,32
NTD Shell (µg)	Dia 1				Dia 2				GL		
Pre-tratamento	Tratamento		Interação pre-tratamento vs tratamento		Tratamento		Interação pre-tratamento vs tratamento				
	F	p	F	P	F	p	F	p		F	p
2	0,699	0,408	601,716	<0,001	0,028	0,868	16,997	<0,001	0,009	0,926	1,36
4	1,891	0,178	721,570	<0,001	1,891	0,178	20,667	<0,001	0,889	0,352	1,36
BNI Core (µg)	Dia 1				Dia 2				GL		
Pre-tratamento	Tratamento		Interação pre-tratamento vs tratamento		Tratamento		Interação pre-tratamento vs tratamento				
	F	p	F	P	F	p	F	p		F	p
2,5	1,496	0,229	989,087	<0,001	1,496	0,229	5,169	0,029	3,759	0,061	1,34
5	8,902	0,005	683,887	<0,001	1,971	0,169	2,003	0,165	14,036	<0,001	1,36
BNI Shell (µg)	Dia 1				Dia 2				GL		
Pre-tratamento	Tratamento		Interação pre-tratamento vs tratamento		Tratamento		Interação pre-tratamento vs tratamento				
	F	p	F	P	F	p	F	p		F	p
2,5	0,169	0,683	542,887	<0,001	0,095	0,760	40,587	<0,001	2,196	0,147	1,36
5	0,063	0,803	541,203	<0,001	0,063	0,803	14,235	<0,001	2,299	0,138	1,36

Tabela 4: Critérios do DSM-IV.

Critérios do DSM-IV-RT para diagnóstico da síndrome de dependência de substância

- Tolerância (observada pela necessidade de consumir doses maiores para obtenção do efeito desejado).
 - Abstinência (definida por uma série de sintomas desagradáveis quando a substância não é consumida).
 - A substância é freqüentemente consumida em maiores quantidades ou por um período mais longo do que o pretendido.
 - Existe um desejo persistente ou esforços mal-sucedidos no sentido de reduzir ou controlar o uso da substância.
 - Muito tempo é gasto em atividades necessárias para a obtenção da substância, na utilização, ou na recuperação de seus efeitos.
 - O uso da substância continua, apesar da consciência de ter um problema físico ou psicológico persistente ou recorrente que tende a ser causado ou exacerbado pela substância.
-